



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA QUÍMICA**



**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN REACTOR FERMENTADOR  
PARA PRODUCIR ALCOHOL ETÍLICO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**IVAN NAPOLEÓN CONDORI ONOFRE**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**PUNO - PERÚ**

**2000**



## DEDICATORIA

*Con cariño y mucho amor, a los autores de mis días, mis padres JOEL ENRIQUE y CARMEN TEODORA, por permitirme mi realización en el campo de la Ingeniería.*

*A Yobana mi compañera de siempre y a mis hijos Christiam, Joel, Jesyd e Ian, porque ellos son la fuerza que me impulsa a la superación diaria.*

***Ivan Napoleón***



## AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Ingeniería Química, por haber impreso en mí persona el compromiso de ser profesional capaz de enfrentar cualquier adversidad en el campo de la ingeniería.

A nuestros dilectos ingenieros que como profesores, supieron transmitirnos sus enseñanzas y de esta manera lograr la profesión que me había propuesto al inicio de mi carrera profesional.

A mi director y asesor de tesis, al Ing. Higinio Zúñiga Sánchez, por su contribución y su asesoramiento hasta la culminación del presente trabajo.

*Ivan Napoleón*



# ÍNDICE GENERAL

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**ÍNDICE GENERAL**

**INDICE DE TABLAS**

**INDICE DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

**RESUMEN** ..... 10

**ABSTRACT**..... 11

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

**1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**..... 12

**1.2. OBJETIVO GENERAL** ..... 13

**1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS** ..... 13

**1.4. JUSTIFICACIÓN** ..... 13

## **CAPITULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

**2.1. ANTECEDENTES:**..... 15

**2.2. ALCANCES**..... 16

**2.3. MARCO TEÓRICO** ..... 18

2.3.1. La bio-tecnología ..... 18

2.3.2. Fundamentos bio-químicos de la fermentación alcohólica..... 20

2.3.3. Crecimiento celular ..... 35

2.3.4. Materias primas..... 47

2.3.5. Levaduras o enzimas ..... 48

2.3.6. Operaciones y procesos ..... 49

2.3.7. Fermentación ..... 52

2.3.8. Rendimiento del fermentador ..... 53

2.3.9. Bio-reactor ..... 54



2.3.10. Operaciones de los reactores tipo tanque.....	64
2.3.11. Selección del equipo .....	65
2.3.12. Cinética de las reacciones de fermentación .....	66

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.1. PRINCIPIOS GENERALES DE DISEÑO.....</b>	<b>78</b>
3.1.1. Materiales.....	78
3.1.2. Mezclado.....	84
3.1.3. Sistema de agitación.....	87
3.1.4. Transmisión de calor .....	88
3.1.5. Esterilización .....	89
3.1.6. Geometría del reactor.....	92

### **CAPITULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN (CÁLCULOS DE INGENIERIA)**

<b>4.1. DISEÑO DEL EQUIPO .....</b>	<b>94</b>
4.1.1. Balance de materia en el fermentador .....	95
4.1.2. Balance de energía.....	100
4.1.3. Cálculo del volumen del reactor.....	102
4.1.4. Calcular el espesor de las paredes del reactor .....	103
4.1.5. Cálculo del sistema de agitación .....	104
4.1.6. Cálculo del sistema de calentamiento .....	106
4.1.7. Cálculo del sistema de enfriamiento .....	108
4.1.8. Cálculo del serpentín .....	111
4.1.9. Cálculo de la potencia del bombeo de aire.....	114
4.1.10. Requerimientos para la construcción del fermentador .....	116
<b>4.2. MONTAJE DEL EQUIPO .....</b>	<b>116</b>
4.2.1. Especificaciones del equipo .....	116
4.2.2. Área del trabajo recomendable.....	117



4.2.3. Operación .....	118
4.2.4. Mantenimiento.....	118
4.2.5. Normas de seguridad .....	119
<b>4.3. EVALUACIÓN ECONÓMICA.....</b>	<b>119</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>122</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>123</b>
<b>MANUAL DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR .....</b>	<b>124</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>127</b>

**Área:** Química Biológica

**Línea:** Simulación y Modelamiento de Procesos en estado estacionario y dinámico.

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 27 de enero de 2000



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Biotecnología en el tiempo .....	19
<b>Tabla 2:</b>	Nuevas técnicas en el avance de la biotecnología .....	19
<b>Tabla 3:</b>	Composición promedio de la melaza .....	47
<b>Tabla 4:</b>	Semejanzas entre reactores y bio-reactores .....	54
<b>Tabla 5:</b>	Datos de mezclado para la columna de burbujeo y reactores de elevación con aire.....	60
<b>Tabla 6:</b>	Sistema de bio-reactores de lecho fluidizado y algunas aplicaciones.....	62
<b>Tabla 7:</b>	Composición química y microestructura característica de los aceros inoxidables ACI resistentes a la corrosión .....	80
<b>Tabla 8:</b>	Propiedades mecánicas del acero inoxidable .....	82
<b>Tabla 9:</b>	Preparación del mosto en KG.....	97
<b>Tabla 10:</b>	Proceso de la fermentación.....	97
<b>Tabla 11:</b>	Depósito del fermentado .....	98
<b>Tabla 12:</b>	Proceso de destilado .....	98
<b>Tabla 13:</b>	Cálculo del costo del fermentador .....	120
<b>Tabla 14:</b>	Costo del agitador y materiales .....	120
<b>Tabla 15:</b>	Costos indirectos .....	121
<b>Tabla 16:</b>	Balance económico final .....	121



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Esquema general de la fermentación .....	22
<b>Figura 2:</b>	Productos metabólicos de interés comercial bio tecnológico.....	36
<b>Figura 3:</b>	Fases de crecimiento y correspondientes velocidades de crecimiento .....	38
<b>Figura 4:</b>	Efectos de la concentración de sustratos sobre la tasa específica de crecimiento .....	42
<b>Figura 5:</b>	Gráfica doble recíproco de $1/\mu$ vs $1/S$ .....	43
<b>Figura 6:</b>	Efectos del pH sobre $\mu_{max}$ .....	45
<b>Figura 6:</b>	Bio – reactor (A) tanque agitado, (B) columna de burbujas, (C) aireador con tubo central, (D) de circuito (E) de inyección .....	56
<b>Figura 7:</b>	Reactor de lecho fluidizado (C.W. agua fría).....	63
<b>Figura 8:</b>	Reactor de lecho fluidizado para partículas con una densidad más baja que el agua.....	63
<b>Figura 9:</b>	Gráfica de Lineweaver - Burk .....	70
<b>Figura 10:</b>	Gráfica de Eadie – Hofstee .....	70
<b>Figura 11:</b>	Gráfica de linealización .....	71
<b>Figura 12:</b>	Gráfica inhibidor competitiva de Michaelis Menten. ....	72
<b>Figura 13:</b>	Gráfica de la inhibición incompetiva .....	73
<b>Figura 14:</b>	Gráfica de la inhibición no competitiva .....	74
<b>Figura 15:</b>	Fases del crecimiento microbiano .....	76
<b>Figura 16:</b>	Contenido de cromo y níquel de acuerdo a los estándares ACI para los aceros inoxidables resistentes al calor y a la corrosión. ....	79
<b>Figura 17:</b>	Diagrama de flujo cuantitativo en kilogramos .....	99
<b>Figura 18:</b>	Calor de reacción a las condiciones de operación a 37 °C .....	101
<b>Figura 19:</b>	Calculo de la fuerza impulsora de la temperatura .....	114





## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

pH	: Potencial de hidrógeno
L	: Litro
ml	: Mililitro
CaCo <sub>3</sub>	: Carbonato de calcio
D	: Densidad
m.	: Masa
V	: Volumen
Kg	: Kilo gramo
g.	: Gramo



## RESUMEN

El proyecto de “DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FERMENTADOR, PARA LA OBTENCIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO”, a partir de los azúcares de frutas y de la melaza, se realizó con el fin de equipar el laboratorio de procesos de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA-Puno. El fermentador se selecciona de acuerdo a las condiciones y necesidades de la zona y considerando el estudio realizado por SCRAGG A. en su obra Biotecnología para ingenieros, donde se determina las levaduras, el proceso de las reacciones, la cinética de reacción, mediciones físicas, así como los factores que favorecen el desarrollo de la fermentación. La materia prima que se usa principalmente es la sacarosa, para obtener 9,475 l de alcohol etílico, se necesita 28,6 Kg. de melaza el cual contiene 14,3 Kg. de sacarosa en un tiempo de 48 horas y a una temperatura de 37°C, Los materiales que se seleccionan en la construcción del equipo, son de tipo inoxidable, que se usa normalmente en los equipos bioreactores, por ello se selecciona el CF-8 304; el agitador es de acero inoxidable y el serpentín de cobre. El diseño del equipo es el modelo “Reactor Batch” de tanque agitado, de un volumen total de 96,84 litros, en el que la presión de operación es de 1 atmósfera y la temperatura de 37°C, el espesor del reactor se determinó 1/16 pulgadas y el agitador es impulsado por un motor de 0,5 HP. El montaje del equipo se hace en partes, primero el cilindro externo e interno, en el externo lleva los soportes, el manómetro y la termocupla, el agitador está en la parte superior y por fuera de la tapa impulsado por un motor, luego el agitador se introduce al cilindro interno donde también está el serpentín y el inyector de aire.

**Palabras clave:** Melaza, encima, fermentación, cinética enzimática, reactor.



## ABSTRACT

The project "DESIGN AND CONSTRUCTION OF A FERMENTER, TO OBTAIN ETHYL ALCOHOL", from fruit sugars and molasses, was carried out in order to equip the process laboratory of the Faculty of Chemical Engineering of the UNA-Puno. The fermenter is selected according to the conditions and needs of the area and considering the study carried out by SCRAGG A. in his work Biotechnology for engineers, where the yeasts, the reaction process, the reaction kinetics, physical measurements, are determined. As well as the factors that favor the development of fermentation. The raw material that is used mainly is sucrose, to obtain 9.475 l of ethyl alcohol, 28.6 kg of molasses is needed which contains 14.3 kg of sucrose in a time of 48 hours and at a temperature of 37 °C, The materials that are selected in the construction of the equipment are of the stainless type, which is normally used in bioreactor equipment, for this reason the CF-8 304 is selected; the stirrer is made of stainless steel and the coil of copper. The design of the equipment is the "Reactor Batch" model of stirred tank, with a total volume of 96.84 liters, in which the operating pressure is 1 atmosphere and the temperature is 37 °C, the thickness of the reactor was determined 1 / 16 inch and the agitator is driven by a 0.5 HP motor. The assembly of the equipment is done in parts, first the external and internal cylinder, on the outside it carries the supports, the pressure gauge and the thermocouple, the stirrer is on the top and outside the lid driven by a motor, then the stirrer it is introduced to the internal cylinder where there is also the coil and the air injector.

**Keywords:** Molasses, enzyme, fermentation, enzyme kinetics, reactor.



# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo “DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN FERMENTADOR, PARA LA OBTENCIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO”, tiene la finalidad de lograr la implementación del Laboratorio de Procesos Unitarios, de la Facultad de Ingeniería Química, contribuyendo a desarrollar la investigación tecnológica en el departamento de Puno, asimismo formular programas de capacitación, utilizando los recursos naturales que produce la región, que por falta de una adecuada planificación estratégica, no se procesan y tienden a malograrse en los lugares de producción.

La melaza de caña de azúcar, va a ser utilizada como un parámetro de medida y comparación con el jugo de naranja y piña, con los cuales se podrá experimentar y obtener los datos necesarios para operar un bioreactor en la ciudad de Puno, específicamente en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es conocido que la teoría tecnológica de fermentación ha tenido un impacto significativo en la producción industrial del etanol y ácido cítrico. Últimamente los esfuerzos están orientados a la producción de otros ácidos orgánicos tales como ácido láctico, acético, propiónico, butílico. También la producción de solventes y combustibles, que ha sido un área de investigación intensiva. Entre otros productos, metano, acetona, butanol, glicerol y metanol, han sido blanco de muchos trabajos experimentales. En general la tecnología de fermentación está intentando emerger como alternativa a la meta petroquímica en la producción de muchos productos químicos orgánicos. Es por ello que, la Facultad de Ingeniería Química de la UNA Puno, debe estar acorde a los avances científicos y tecnológicos de la fermentación.



## **Descripción del problema**

Con el diseño y construcción de un reactor fermentador para producir alcohol etílico a nivel de laboratorio para procesar melaza de caña de azúcar y zumos de naranja y piña se pretende incentivar la investigación biotecnológica, para procesar nuestros recursos y obtener otros productos por fermentación.

### **Problema general**

¿Cuál es el cálculo y diseño de un fermentador, para obtener básicamente alcohol etílico de melaza, zumos de naranja y piña; qué fundamentos tecnológicos se deben aplicar para su construcción?

## **1.2. OBJETIVO GENERAL**

Calcular, seleccionar, diseñar, construir, instalar y poner en funcionamiento un reactor de fermentación para obtener alcohol etílico a partir de melaza de caña de azúcar.

## **1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.3.1 Obtener alcohol etílico a partir de la melaza de caña de azúcar.

1.3.2 Determinar los parámetros de operación (temperatura, pH, el tiempo de operación) para el fermentador y elaborar su manual de operación.

## **1.4. JUSTIFICACIÓN**

La producción de bebidas alcohólicas ha sido una actividad ligada a la mayoría de las culturas durante milenios. En forma empírica los seres humanos aprendieron a encauzar las fermentaciones alcohólicas de diversos substratos.

Debido a la gran importancia de estos productos la investigación científica y tecnológica relacionada con la producción de alcoholes, ha encontrado grandes esfuerzos desde el siglo pasado. Esta industria es dentro de las industrias biotecnológicas, la de mayor importancia económica en el mundo, y los avances en el conocimiento, que se han



logrado, ha sido explotado en muchas aplicaciones de la bio-tecnología y la tecnología de los alimentos a lo largo de más siglo y medio.

Uno de los productos químicos de mayor consumo en la industria, es el alcohol, aproximadamente 175 millones de galones (662,2 millones de litros) se producen anualmente, siendo uno de los mayores productores EE.UU. Más de la mitad se obtiene del etileno, pero no tanto así, como la producción por fermentación de derivados de productos vegetales, siendo el principal producto obtenido del etanol de los residuos de la producción de azúcar de la caña de azúcar, conocido como melaza, de cuya fermentación utilizando levaduras, se obtiene una disolución de alcohol de concentración entre el 6 y el 10% que luego se destila por columnas de fraccionamiento para obtener alcohol de 55 grados de pureza.

La producción de naranja en la sub región de Puno, es de alrededor de 21 980 TM. y de la piña 13 190 TM. de acuerdo a la información estadística del Ministerio de Agricultura – Oficina de informática Agraria.

De esta producción de 50% se desperdicia, debido a la falta de una transformación industrial; para evitar que estas frutas se pudran, con el fermentador se puede aprovechar una parte de ésta y luego proceder a su expendio como alcohol, ya que la Facultad cuenta con un destilador, que permitirá obtener un producto de buena calidad.

Por consiguiente el cálculo, diseño y construcción del Fermentador se justifica, primero por la necesidad del Laboratorio de Procesos de la Facultad de Ingeniería Química y segundo para aprovechar las frutas (naranja y piña) que se pierden por falta de una adecuada transformación industrial.



## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. ANTECEDENTES:

Un reactor fermentador tipo tanque es “un equipo donde se lleva la reacción Química de fermentación en un sistema cerrado, todos los reactivos se cargan al inicio y al final de la operación, la masa reactiva se descarga a un mismo tiempo y la operación del reactor es de régimen inestable” (1).

La consideración que generalmente se toma en el diseño del reactor tipo tanque batch, es que la mezcla reactiva este bien agitado y por consiguiente la concentración, la temperatura y presión, tenga el mismo valor, a un tiempo determinado de reacción en cualquier punto del reactor.

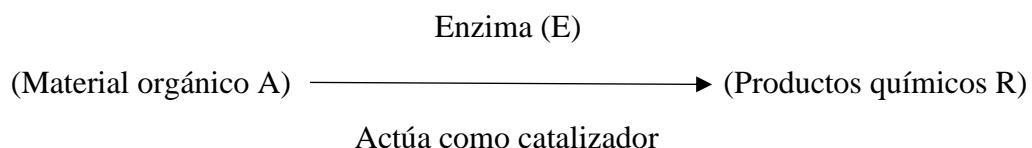
La fermentación se puede utilizar en su significado estricto original como, la producción de alcohol a partir de azúcar. La definición moderna de fermentación es la siguiente: “Desde el más sencillo y el más complejo, los procesos biológicos pueden clasificarse como fermentaciones, procesos fisiológicos elementales y la acción de seres vivos”. (1).

Además las fermentaciones pueden dividirse en dos amplios grupos:

Aquellos promovidos y catalizados por micro organismos o microbios (levaduras, bacterias, algas, mohos y protozoos) y aquellos promovidos por enzimas (productos químicos producidos por microorganismos).

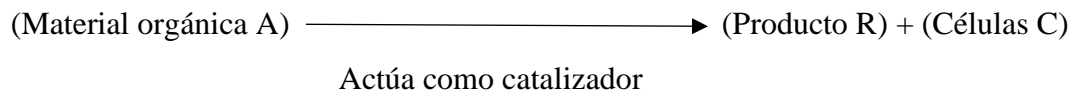
En general las fermentaciones, son reacciones donde una materia prima orgánica se convierte en producto, por la acción de microbios o por la acción de enzimas.

Las fermentaciones enzimáticas se representan por:





Las fermentaciones microbianas se pueden representar por:



La diferencia de estas dos clases de fermentación, es que, la fermentación enzimática es donde el agente catalítico es una enzima, no se reproduce, actúa como un agente ordinario, mientras que en la fermentación microbiana el agente catalítico, es una célula o microbio, que se produce. Dentro de las células, la enzima cataliza la reacción igual que la fermentación enzimática, lo que significa que las células al reproducirse fabrican su propia enzima. (2)

Un fermentador, es un tanque provisto de un agitador, sistema de inyección de aire, sistema de calentamiento o enfriamiento, etc. Con el fin de obtener determinados efectos físicos y químicos en los reactantes. Los materiales usados en la construcción de las unidades de proceso se seleccionan de acuerdo a la resistencia a la corrosión y sus características mecánicas. Los aceros más usados, son los llamados inoxidable. (3)

Para diseñar un reactor tipo tanque se debe seleccionar el tipo de reactor, que son característicos, así como la toma de decisiones sobre el método de operación, el siguiente paso consta en evaluar el funcionamiento del reactor, esto es su tamaño, la composición de la corriente del producto y las condiciones de operación requerida, temperatura, presión y composición del reactor. (4)

Puesto que los reactores de laboratorio son pequeños y relativamente económicos, existe bastante flexibilidad en su diseño. La construcción y las condiciones de operación pueden relacionarse de manera que se reduzcan o se eliminen las diferencias entre las velocidades total e intrínseca, con lo cual es posible obtener ecuaciones más precisas para la velocidad intrínseca en base a datos experimentales.

## 2.2. ALCANCES

Con el cálculo, selección, diseño, construcción, instalación y puesta en marcha del fermentador de investigación, con sus respectivas especificaciones técnicas de ingeniería, cumplimos con implementar el Laboratorio de Procesos de la Facultad de Ingeniería Química, a la vez que sugerimos que se considere el área de bio-tecnología, conjuntamente con bio-ingeniería, para lo cual se alcanzara a los siguientes:





### **2.2.1. BENEFICIARIOS**

Laboratorio de Procesos de la Carrera Profesional de Ingeniería Química, en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

- a) Estudiantes: De la Carrera Profesional de Ingeniería Química de la UNA-Puno, en el curso de Tecnología Industrial de Bio-tecnología.
- b) Profesionales: Del área de bio-procesos especializados en fermentación, docentes de la facultad de Ingeniería Química y estudios afines a Ingeniería Química en Tecnología de Fermentación Aeróbica.
- c) Técnicos: Formación de Técnicos en el área de Bio-procesos o Bio-tecnología.

### **2.2.2. FINES**

Desarrollar trabajos de investigación a nivel de Pre-grado y Post-grado, en Bio-tecnología.

### **2.2.3. DESARROLLO**

Para el perfeccionamiento y el condicionamiento científico y tecnológico de la Fermentación aeróbica.

### **2.2.4. UBICACIÓN DEL PROYECTO**

El trabajo de “Diseño y construcción de un reactor fermentador, para producir alcohol etílico” se desarrolla en:

- Sub región : Puno.
- Provincia : Puno.
- Distrito : Puno.
- Institución : Universidad Nacional del Altiplano.  
Facultad de Ingeniería Química.
- Lugar : Laboratorio de Procesos, área de “Bio-tecnología” de la FIQ-UNA.



### 2.2.5. USOS Y APLICACIONES

El fermentador sirve para producir:

- Etanol y bebidas
- Antibióticos
- Ácido cítrico
- Vitaminas
- Proteínas
- Levadura
- Te, yogurt, alimentos, etc.

## 2.3. MARCO TEÓRICO

### 2.3.1. La bio-tecnología

La Bio-tecnología surgió quizás como una materia independiente con la publicación del informe de Spink en 1980, luego que la European Federation of Biotechnology (Federación Europea de Bio-tecnología) la definiera en 1981. La bio-tecnología o aplicación de organismos, sistemas y procesos biológicos a la industria, no es una materia aislada, sino un área multidisciplinaria que abarca las ciencias de la ingeniería, la biología y la química. Por lo tanto requiere aportaciones de micro-biología, bio-química, biología molecular, genética, química e ingeniería química. Los primeros procesos eran empíricos, pero con los avances de la ingeniería genética y molecular, ya es posible aplicar un criterio más preciso. Estos avances confieren una importancia considerable a la bio-tecnología en la industria, ya que es posible diseñar tecnologías nuevas basadas en recursos renovables. Cada vez es mayor la población no solo de científicos e ingenieros, que advierte el potencial de la bio-tecnología.

A menudo se piensa que la bio-tecnología consiste solo en ingeniería genética y anticuerpos monoclonales. Tener una definición tan simple sería un error puesto que ignora la mayor parte de la bio-tecnología, incluyendo algunas de las áreas más exitosas. En la tabla 1.1, se da la escala de tiempo en evolución de la bio-tecnología.



**Tabla 1:** Biotecnología en el tiempo

ERA	DESCRIPCIÓN
Pre – Pasteur Antes de 1 865.	Bebidas alcohólicas (Cerveza, vino). Productos lácteos (queso, yogurt). Otros alimentos fermentados.
Era Pasteur 1 865-1 940	Etanol, butanol, acetona, glicerol, ácidos orgánicos (ácido cítrico). Tratamiento aeróbico de aguas residuales.
Era de los antibióticos 1 940-1 960	Penicilinas, tecnología de la fermentación sumergida. Gran variedad de antibióticos. Tecnología de la estructura en la célula animal, vacunas contra virus. Transformaciones microbiológicas de esteroides.
Era post- antibióticos 1 960-1 975	Aminoácidos. Proteína celular (S C P Single – cell protein). Enzimas (detergentes). Tecnología de las células y las enzimas inmovilizadas (glucosa, isomerasa). Tratamiento anaeróbico de aguas de deshecho (biogas). Polisacáridos bacterianos (goma de xantan). Gasohol.
Era de la nueva tecnología 1 975 – hasta la fecha	Tecnología de los hibridomas, anticuerpos monoclonales, ingeniería genética (1 976). Pruebas diagnósticas con anticuerpos monoclonales (1 980). Vacunas de origen animal contra la diarrea (1 982). Insulina humana (1 982).

**Fuente:** “Biotecnología para ingenieros” (Scragg A. 1986)

**Tabla 2:** Nuevas técnicas en el avance de la biotecnología

Cultivo de tejidos celulares vegetales y animales. Fusión de protoplastos.
Modificación estructural de proteínas (ingeniería de proteínas).
Células y enzimas inmovilizadas. Biosensores.
Uso de las computadoras en fermentación.
Nuevos diseños de Bio-reactores.

**Fuente:** “Biotecnología para ingenieros” (Scragg A. 1986)



## 2.3.2. Fundamentos bio-químicos de la fermentación alcohólica.

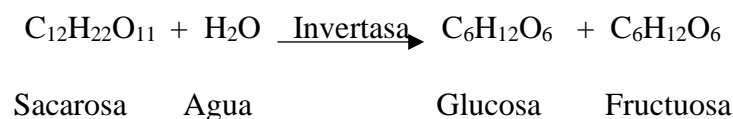
### 2.3.2.1. Fermentación

La fermentación se define como el proceso en que se llevan a cabo desdoblamiento de combinaciones orgánicas, ya sean hidratos de carbono, proteínas, grasas o algún otro tipo de materia orgánica, por acción de catalizadores bioquímicos conocidos como enzimas y que son elaborados por las levaduras, la fermentación alcohólica, se desarrollan según la siguiente reacción química:

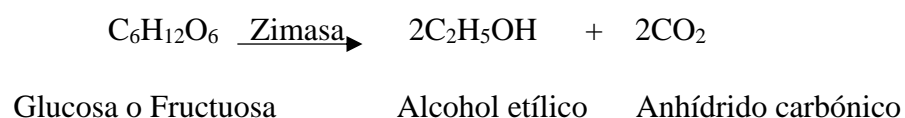


El mecanismo de esta reacción de fermentación de la sacarosa para producir alcohol etílico y anhídrido carbónico, se explica, considerando que la levadura es *Sacharomyces Cerevisiae*, que posee dos enzimas, la invertasa y la zimasa.

La invertasa da lugar a que la sacarosa se hidrolice desdoblándose en una molécula de glucosa y una molécula de fructuosa, es decir que la sacarosa por acción de esta enzima se desdobla en monosacáridos, según la siguiente ecuación:



La zimasa es la enzima que transforma la glucosa y la fructuosa en alcohol etílico y anhídrido carbónico, según la siguiente reacción:





El calor de reacción que desarrolla esta ecuación es:

$$\Delta H = -62,504 \text{ Kcal/mol.}$$

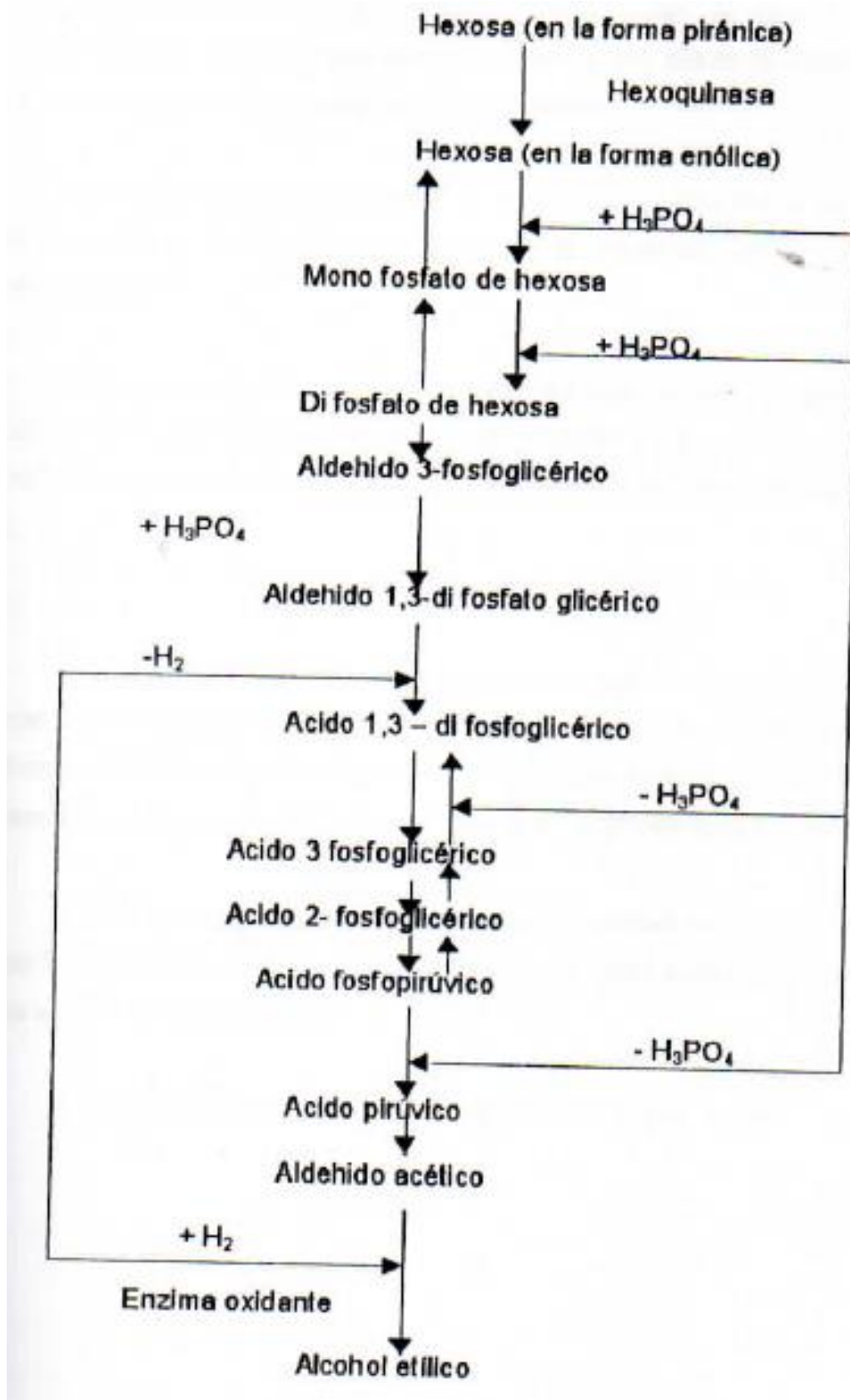
El proceso de transformación es en sí, de mayor complejidad y las reacciones expresadas son solo una síntesis. En realidad, se forman diversos productos REDOX intermedios debido a los diferentes principios activos constituyentes de la zimasa, que actúan selectivamente en cada parte del proceso.

La energía calorífica desprendida durante la fermentación y crecimiento celular de la levadura, sobre todo en el cultivo de la levadura, es que el mosto es adecuado para la proliferación de la levadura; el resto de la energía actúa térmicamente incrementando la temperatura del mosto.

La levadura no actúa únicamente sobre los azúcares, sino también sobre Las aminas, aminoácidos y otras sales amónicas del mosto, productos nitrogenados muy degradados que utiliza para su desarrollo y crecimiento. El ácido láctico aparece en el mosto, ya que paralelamente a la fermentación alcohólica, se produce en ínfima proporción la fermentación láctica.

Con el objeto de facilitar la comprensión del complicado proceso que se realiza en la fermentación, este proceso es resumido en el diagrama 1 en el que se muestra las reacciones que son la base de la fermentación alcohólica, indicando las enzimas que rigen cada reacción.

Las reacciones que se muestran en el diagrama 1 fermentativo, no se realizan en forma espontánea. La migración de hidrogeno, en las reacciones de óxido- reducción, la transposición del radical fosfórico en los fenómenos de fosforilización requieren de la intervención de las enzimas y co-enzimas.

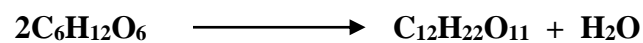


**Figura 1:** Esquema general de la fermentación

El esquema anterior de fermentación es hecho a partir de la glucosa. La fermentación de los disacáridos se explica mediante la existencia de una hidrolasa, llamada sacarosa o invertasa, o la maltosa; esta hidrolasa realiza una hidrólisis, dando lugar a las hexosas a partir de las cuales se efectúa el proceso fermentativo.

En el caso de la fermentación de la sacarosa, ésta hidrólisis se efectúa por la sacarosa o invertasa y se le denomina inversión de la sacarosa, dando lugar a las hexosas, glucosa y fructuosa.

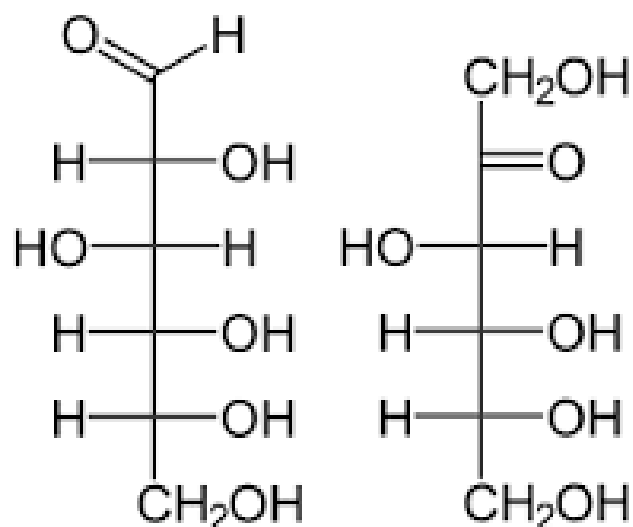
La inversión de la sacarosa es relativamente sencilla, ya que la sacarosa y en general los disacáridos, son compuestos que estequiométricamente se puede considerar como derivados de dos moléculas de monosacáridos por pérdida de una molécula de agua.



Las dos moléculas de monosacáridos se hallan en la sacarosa, unidas entre sí, por medio del enlace de las dos moléculas, eliminando una molécula de agua. Mediante el enlace entre el hidróxido acetálico de una de las, el hidróxido acetálico de la otra molécula. De aquí que la sacarosa carezca de poder reductor ya que no posee ningún carbonillo libre.

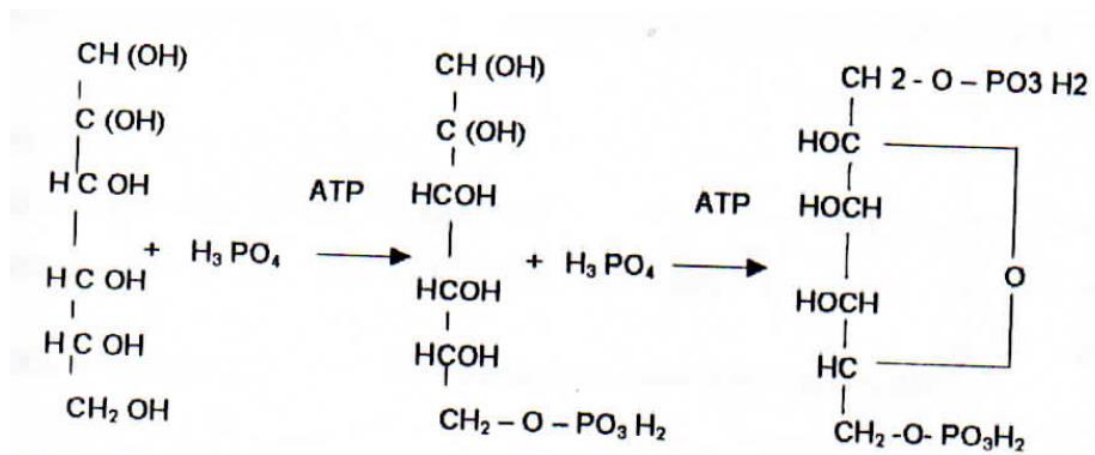
Luego las hexas glucosa y fructuosa producidas por la inversión de la sacarosa pasan de su forma estable (piránica) a una forma común más activa que es la forma por efecto de la acción de la exoquinasa.

La forma enólica de la glucosa y fructuosa es la que sigue:



Es necesario considerar esta forma común enólica a la glucosa, fructuosa y manosa, porque las levaduras que fermentan la glucosa, fermentan también la fructuosa y manosa, por lo que se supone que los tres azúcares tienen una forma enólica única a través de la cual son fermentados por las levaduras, esta consideración se ve reforzada por el hecho que tanto la glucosa, fructuosa y manosa siempre dan lugar al ester 1-6 difosfórico de la fructo fumarosa, sea cual fuere la hexosa de la cual se formó.

Luego de esta forma enólica más activa, la glucosa y fructuosa entran en la fase preparativa de demolición la cual consiste en la esterilización de la molécula de hexosa por el ácido fosfórico, formado primero el mono ester 6-fosfórico de la forma enólica y luego el diester 1-6 di fosfórico de la fructo furanosa. La esterilización inicial se desarrolla en el fosfato inorgánico presente en el medio. Esta esterilización se desarrolla bajo la acción de la fosforilasa, actuando con la co-enzima el ácido adenínico en su forma trifosforilada (ácido adenosin trifosfórico ATP).



Forma común enólica de  
glucosa y la fructuosa

Ester 6 fosfórico de la forma  
enólica

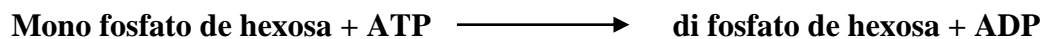
Ester 1-6 di fosfórico  
de la fructo-furanosa

En realidad el ácido fosfórico es transportado por la co-fosforilasa, la cual lo lleva a la hexosa con lo que se origina el mono fosfato de hexosa, en primer lugar y en la última fosforilización aparece ya el di fosfato de hexosa, a la vez que se produce el ácido adenosin di fosfórico.



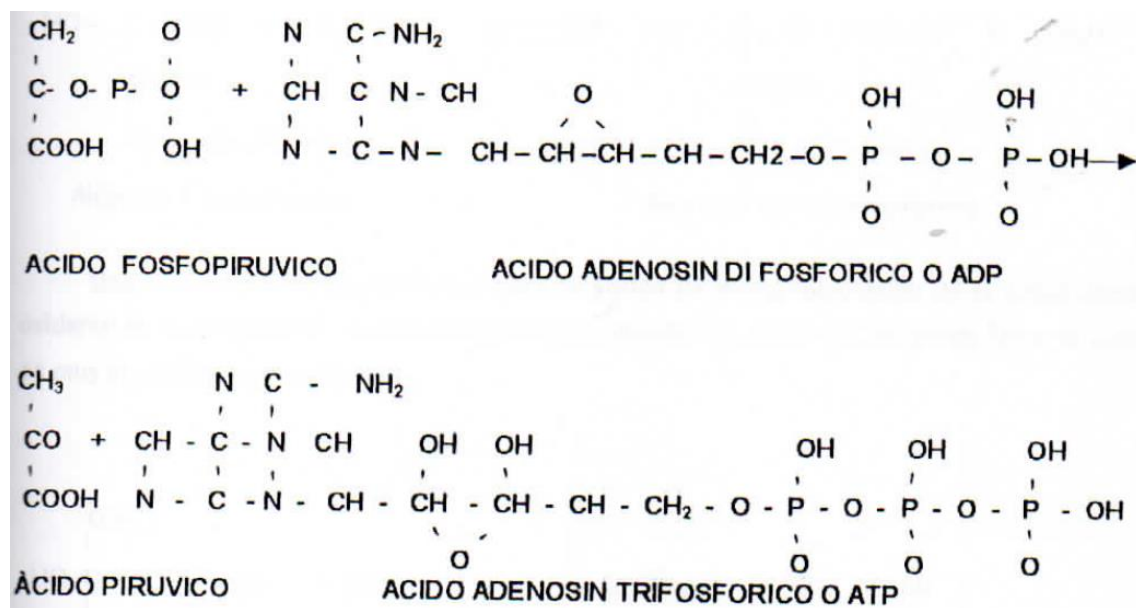


Luego:



Con el objeto de aclarar algo más, se muestra de qué modo el fosfato primeramente ligado a la hexosa y que después sigue el proceso fermentativo hasta el ácido fosfopirúvico, vuelve al ciclo normal desasimilativo.

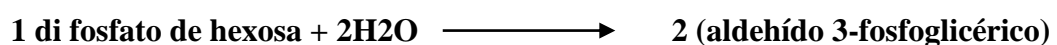
El ácido fosforirúvico actúa con el Adenosin tri fosfórico o ATP llamado también cofosforilasa, según la reacción irreversible.



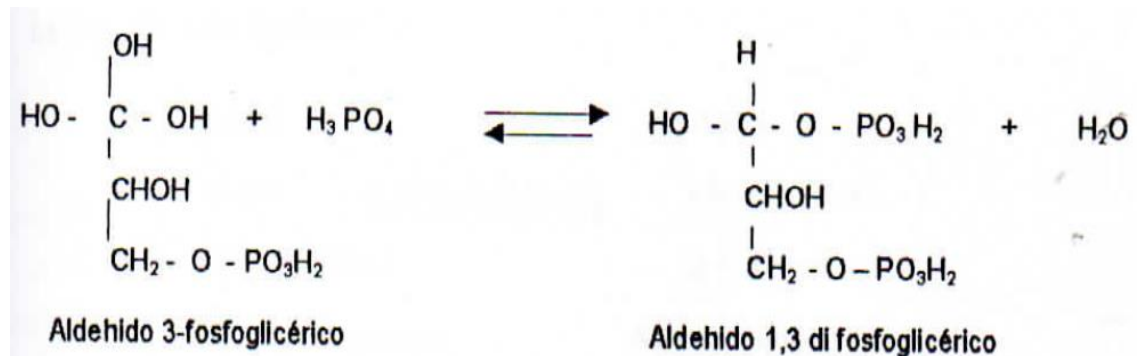
Este ácido adenosin trifosfórico o co-fosforilasa en el que transporta el fósforo para la fosforilización de la hexosa.

Luego de la fase de fosforilización, el di fosfato de hexosa, producido, se transforma en aldehído 3-fosfoglicérico bajo la acción enzimática de la aldolasa, que es la enzima que rige este proceso.

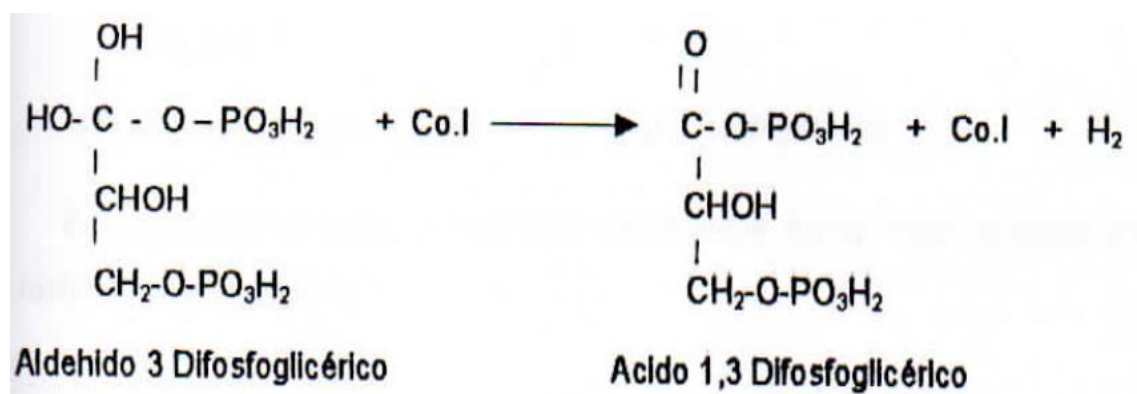
La reacción que se supone es desarrollada como sigue:



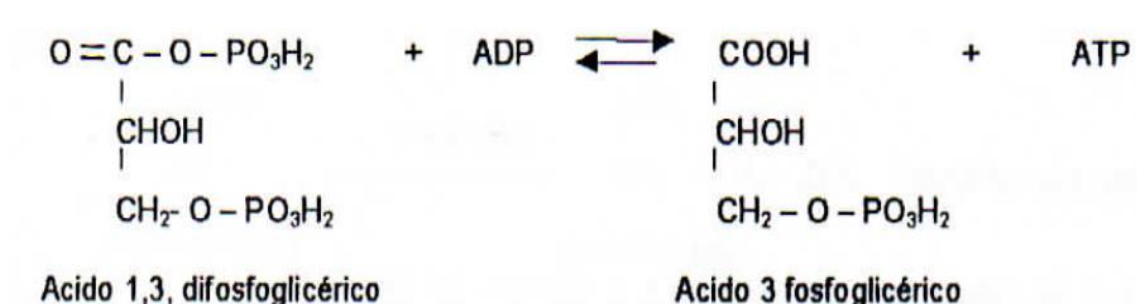
Luego el aldehído 3 fosfoglicérico reacciona con el ácido fosfórico, o con un mineral fosfatado, originando la siguiente reacción irreversible, con la formación de aldehído 1,3 difosfoglicérico.



Sobre estos aldehídos, se lleva a cabo la acción de des hidrogenación de la apo-enzima oxidante de la co-enzima1, con la consiguiente formación del ácido 1,3 difosfoglicérico, el cual es muy inestable, la reacción es:

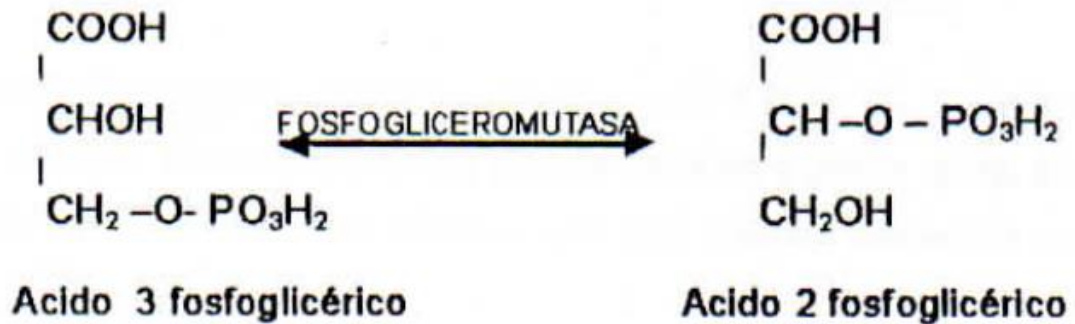


Debido a la inestabilidad del ácido 1,3 di fosfoglicérico, se transforma en el ácido 3 fosfoglicérico, por acción del ácido Adenosin di fosfórico o ADP, dando como otro producto el ácido Adenosin Trifosfórico o ATP o co-fosforilaza (que actúa en la fosforilización)



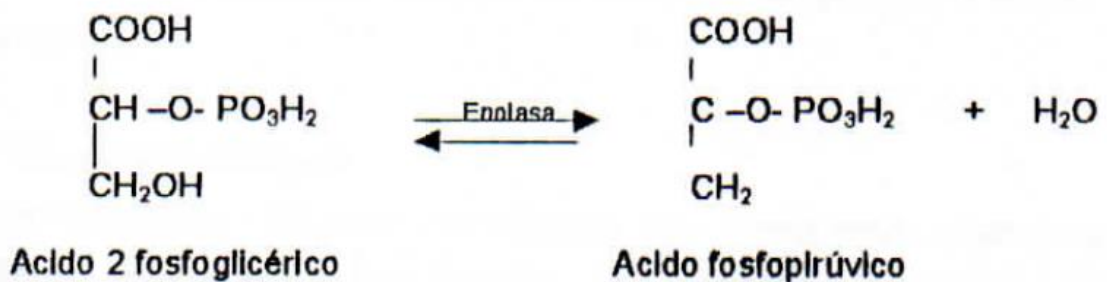
Luego el ácido 3 fosfoglicérico se transforma en el ácido 2 fosfoglicérico, por acción de la fosfogliceromufasa.

La reacción es la siguiente:

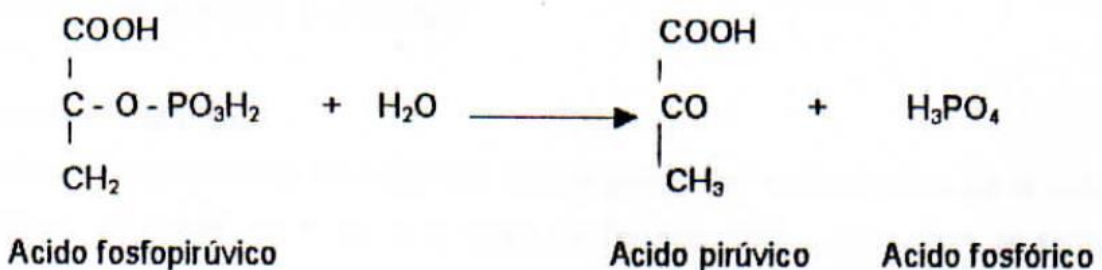


Luego, el ácido 2 fosfoglicérico se transforma en ácido fosfopirúvico por la acción de la enolasa.

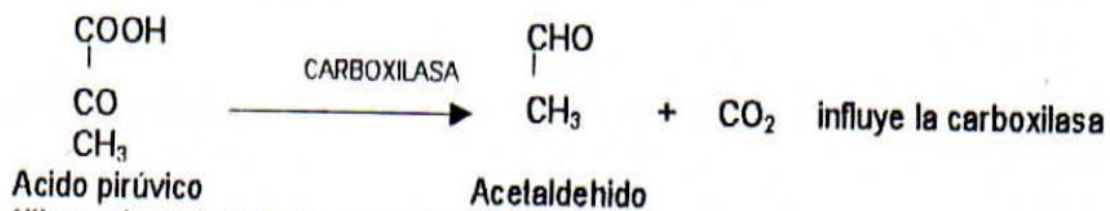
La reacción es:



Seguidamente el ácido fosfopirúvico se hidroliza dando lugar al ácido pirúvico y al ácido fosfórico. La reacción es:

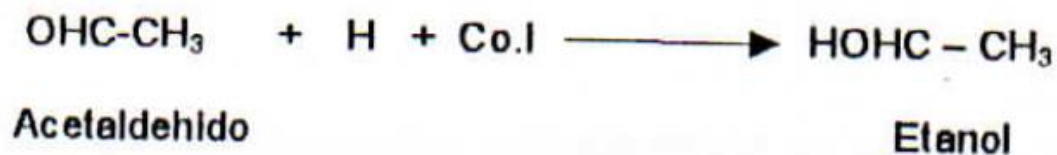


Ahora el ácido pirúvico es reducido a acetaldehído y anhídrido carbónico. La reacción es la siguiente:



Por último el acetaldehído es reducido a alcohol etílico, por acción de la apoenzima reductora de la co-enzima 1.

La reacción es:



Este desarrollo del proceso de fermentación esta hecho de acuerdo a las investigaciones realizadas por muchos científicos, de las cuales ha sido posible dicho esquema, el cual puede estar sujeto a rectificaciones futuras, ya que ciertos aspectos no han sido aclarados totalmente.

#### 2.3.2.2. Tipos de levadura

Una clasificación práctica de las levaduras de acuerdo a su uso en la industria es la siguiente:

##### A. Levadura cultivada

Las levaduras cultivadas son aquellas que se producen originalmente de la naturaleza mediante generaciones innumerables, han adquirido propiedades especiales que son fundamentales para la obtención de un producto de buena calidad. B – amilaza (grano de cebada), papaína (papaya), renina (bovino), lisozima (albúmina de huevo de bovino).

- Levadura de cervecería
- Levaduras de destilería y prensada.



## B. Levaduras naturales

Son aquellas que se presentan en forma libre en la naturaleza. Algunas de estas, pero no muy lejos de hacerlo, todas estropean la fermentación dando lugar a compuestos indeseables.

Las levaduras según el movimiento durante la fermentación se clasifican en dos grupos:

### 1. Levaduras altas.

Son aquellas que se desarrollan ascendiendo durante la fermentación hasta la superficie del líquido en fermentación, en donde permanece bien como cepa uniformemente distribuida o bien como anillo en la pared del recipiente o cuba de fermentación.

### 2. Levaduras bajas.

Son aquellas que se desarrollan exclusivamente en el fondo del recipiente o cuba de fermentación. Pero durante la fermentación es lanzada hacia las partes superiores del líquido como consecuencia de la formación del anhídrido carbónico.

## C. Levaduras de destilería.

Es una variedad de la *Saccharomyces cerevisiae* que tiene la característica de ser bastante estable y tolerar altas concentraciones de alcohol etílico (12%), sin perjudicar su calidad fermentativa. Hay levaduras que soportan hasta el 17% del alcohol etílico, pero tiene el inconveniente que no fermenta todo el azúcar presente en el mosto a fermentar.

La *Saccharomyces cerevisiae* tiene dos enzimas.

La invertasa que da lugar a que la sacarosa se hidroliza, formando una molécula de glucosa y una molécula de fructuosa.

La zimasa que transforma la glucosa y fructuosa formados en alcohol etílico y anhídrido carbónico. En realidad esta zimasa está constituida por varias enzimas y co-enzimas, las cuales en conjunto originan la fermentación alcohólica.



### 2.3.2.3. Estequiometria

La ecuación estequiométrica generaliza se puede escribir de la siguiente manera:



Donde:

A,B,D,M,P,Q = Son los moles de los compuestos respectivos.

Ca, Hb, Oc = Es una fuente generalizada de carbón energía

M = Es el mol o moles de una unidad celular (CHON)

Por ejemplo una levadura típica puede ser representada por:

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , de este modo la fracción orgánica de las células tiene un peso molecular de 145. Si la célula es 90% orgánica y 10% ceniza, la fórmula global del peso de una unidad celular es  $145/0,9=161$ . De esta relación estequiométrica uno puede ver que la relación de la masa de las moléculas formadas por masa de substrato consumido (M/A), referido como el rendimiento celular, es dependiente de la eficiencia de la utilización de la fuente de carbono para la combustión a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , para obtener energía del crecimiento.

Además de este balance, es posible idear una relación entre el rendimiento de las células y los requerimientos en oxígeno.

$$\frac{\text{g Oxígeno}}{\text{g celulosa}} = \frac{32C+8H-16O+1,0(O')-2,67(C')+1,7(N')-8,0(H)}{YMw} \text{ (Metales G)}$$

Donde:

C, H, O = Número de átomos por molécula de substrato.

C', O', N' = Son las fracciones de C, O, N y H en la célula.

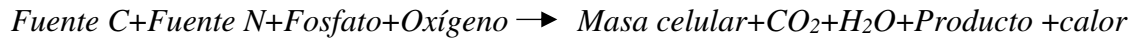
Y = Coeficiente de rendimiento celular  
(g de célula/ g de substrato) para la fuente de carbón.

Mw = Peso molecular de la fuente de carbón.



De esta expresión está claro que el oxígeno requerido, es inversamente proporcional al rendimiento celular, que es una medida de la eficiencia de conversión de la fuente de carbón a masa celular.

La estequiometría global para el crecimiento celular y formación de productos, se puede escribir en forma general, como sigue:



#### 2.3.2.4. Termodinámica

Criterios termodinámicos del calor de reacción.

Ya que las reacciones bioquímicas se realizan generalmente a temperaturas y pH constantes, el balance de energía se evalúa frecuentemente en forma independiente del balance de materia.

El metabolismo quimiotrófico, exotérmico, su eficiencia es solo de un 40 %, por lo que se desprende una gran cantidad de calor, la cantidad específica de calor puede ser determinada por un balance de entalpía como en cualquier reacción química.

$$H_r = P H_p + C H_c - A H_A \quad (\text{Miller y Melik})$$

Donde:

P, C, A = Representa los moles de los productos celulares y substratos involucrados.

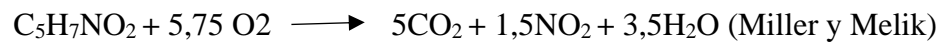
H<sub>p</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>A</sub> = Son las correspondientes entalpías molares.

Los valores de entalpía vienen dados por los calores estándar de formación, ajustados a las condiciones de temperatura del reactor integrando las capacidades caloríficas.

Como una aproximación para definir el calor de la formación de una célula, se ha encontrado que la fórmula molecular empírica C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> de



un estimado razonable para muchos miembros, la ecuación para la conversión completa de dicha materia es:



El calor de combustión de esta reacción es de 5,3 Kcal/mol. De masa de célula seca.

En ausencia de datos de calor de fermentación y de la capacidad científica, el calorímetro ofrece una manera directa de calcular el calor neto de reacción.

El calorímetro adiabático estándar es adecuado si el aumento de temperatura es pequeña, en otros casos es mejor usar un reactor de temperatura constante.

Otra técnica productiva se basa en el principio de la bio-oxidación constante, la cual dice que todos los micro organismos intentan oxidar completamente el sustrato que servía como un donante de electrones, los organismos almacenan la energía obtenida del sustrato en la forma de ATP (Adenosin trifosfato), que es un compuesto altamente energético que se descompone rápidamente en ADP (Adenosin difosfato) o AMP (Adenosin monofosfato).

Al final todos los electrones donados por un sustrato, determinan reduciendo un reactor de neutrones. Para las fermentaciones anaeróbicas, el oxígeno es el receptor universal, una variedad de iones inorgánicos sirven como receptores.

#### **2.3.2.5. Cinética de la fermentación**

La fermentación puede ser considerada como una reacción catalítica, las células y las enzimas promueven las reacciones, pero no son consumidas por ellos.

La velocidad con el que los biocatalizadores convierten el sustrato en un producto se muestra en la ecuación.



$$\frac{dc_r}{dt} = - \frac{d(UC_1)}{dx} + \frac{DdC_1}{dx^2} - r_1 - K_{ms} (C_r C_1) \quad (\text{Smith J.M. pág. 39})$$

Los modelos cinéticos deberán ser lo suficientemente complejos para ser realistas, pero a su vez lo suficientemente simples para que sus parámetros puedan ser estimados a partir de datos disponible.

Una ecuación empírica, en donde la velocidad de asimilación del sustrato limitante por unidad de volumen, es una función de las características del sustrato y de la célula.

Para la fermentación microbiana, que en su volumen contenga bacterias o levaduras se tiene:

$$\Gamma_a = \frac{dc_a}{dt} = - \frac{U_{\max} C_a C_f}{(Y_c / A)(K_m + C_a)} \quad (\text{Smith J.M. pág. 40})$$

$U_{\max}$  = Es la máxima velocidad de crecimiento obtenido de las células en unidades de crecimiento fraccionadas por unidad de tiempo.

$K_m$  = Es la constante cinética general.

$(Y_c/A)$  = Es un factor de rendimiento de celular que entran en juego, porque las células convierten una pequeña porción del sustrato en nuevas células, en una especie de autocatalizador.

Por tanto:

Sustrato limitante celular producto más células, los factores de rendimiento de células y productos están definidos como la masa de células (C) o productos (P), formado por una unidad de sustrato consumido (A), Definido:  $C_{ao}$ ,  $C_{po}$ ,  $C_{AO}$ , como concentraciones iniciales g/l. de células, productos y sustratos.



$$\frac{Y_c}{A} = \frac{C_c - C_{\infty}}{C_{A0} - C_A}$$
$$\frac{Y_c}{A} = \frac{C_P - C_{P0}}{C_{A0} - C_A} \quad (\text{Smith J.M. pág. 41})$$

Como una aproximación, los factores de rendimiento son tomados como constantes para cualquier estado particular de una fermentación.

Una vez conocido los factores de rendimiento los valores de  $U_{\max}$  y  $K_m$ , permanecen para ser determinados.

Estos pueden ser determinados a partir de los datos experimentales, tomados de una fermentación continua del tanque agitado a escala de laboratorio.

La ecuación se simplifica aún más cuando se aplica a la generación de células antes que el consumo término  $V_c/A$

Puede ser admitido. Asumido una mezcla perfecta, sin limitaciones de difusión o transferencia de masa la ecuación de velocidad se reduce a la siguiente forma cinética.

$$\Gamma_c = \frac{U_{\max} C_c C_A}{K_m + C_A} \quad (\text{Smith J.M. pág. 43})$$

Para un reactor continuo de tanque agitado en estado estacionario ( $d_{cc}/dt=0$ ) y con la alimentación estéril ( $C_{c0}=0$ ) este modelo se simplifica en una forma que puede ser resuelto algebraicamente.

$$\frac{E}{V} = \frac{U_{\max} C_A}{K_m + C_A} \quad (\text{Smith J.M. pág. 44})$$

El balance para un reactor batch, involucra ecuaciones diferenciales y por lo tanto son más difíciles de resolver.



La ecuación puede ser cambiada en una forma más conveniente, mediante la definición del tiempo – espacio (T), como la relación de volumen sobre flujo o (V/F) para una alimentación estéril.

$$T = \frac{1}{U_{\max}} + \frac{K_m}{U_{\max}} \frac{1}{C_f} \quad (\text{Smith J.M. pág. 44})$$

Si la ecuación describiera precisamente la cinética, una gráfica de T vs  $1/C_f$  debería ser lineal. En este caso  $K_m$ ,  $U_{\max}$ , pueden ser determinados directamente por la pendiente y el intercepto con el eje de las ordenadas.

Nomenclatura de las ecuaciones cinéticas.

C = Concentración

F = Flujo volumétrico

V = Volumen

$K_m$  = Coeficiente de transferencia de masa.

$U_{\max}$  = Velocidad máxima de crecimiento de los microbios.

Y = Fracción del coeficiente de rendimiento.

A = Substrato, limitante

C = Células

P = Productos

O = Inicial o condiciones de entrada

### 2.3.3. Crecimiento celular

Para completar el ciclo vital, los organismos vivos tienen que ingerir nutrientes, transformarlos en compuestos intermedios sutiles, los que, con una transformación adicional, serán incorporados a la estructura celular al mismo tiempo, los subproductos metabólicos tienen que ser retirados del sistema celular.

Entonces en un entorno dado, la presencia de microorganismos se observará el consumo de algunos componentes (substratos) y la acumulación de nuevos componentes (productos) metabólicos, junto con un aumento de la población de microorganismos.

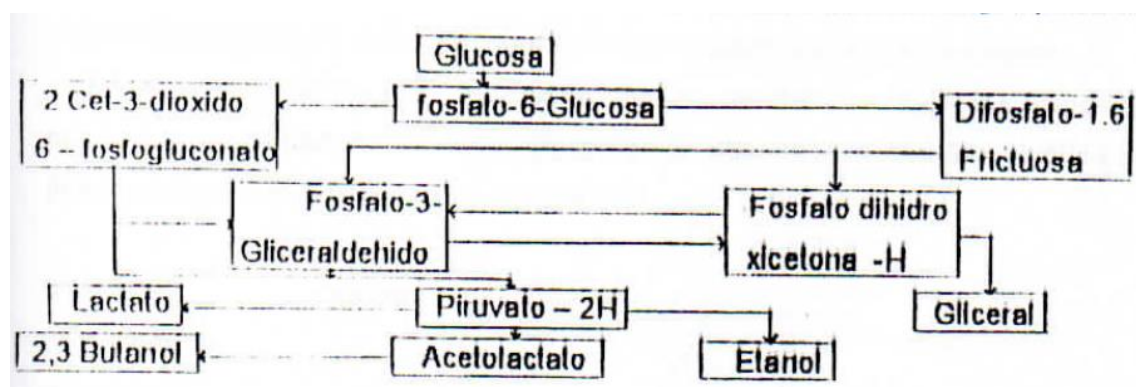
El consumo de producción de compuestos químicos es ejecutado por los microorganismos a través de un gran número de reacciones catalizadas enzimáticas muy bien integradas y coordinadas.

Durante su adaptación a su nuevo ambiente, los microorganismos inhiben la síntesis de algunas enzimas y proteínas, para favorecer la producción de otros, esto puede resultar en la producción de diferentes componentes metabólicos y un aumento o disminución en la velocidad del crecimiento del microorganismo.

Los cambios ambientales que pueden ocurrir, inducen acumulación de productos, alternación de la disponibilidad del sustrato, en el pH o en la temperatura, entre otros cambios posibles. Seleccionando las condiciones apropiadas, bio proceso, tal como la fermentación, puede tomar ventajas de la adaptabilidad de los microorganismos para productos componentes químicos comerciales.

Algunas bacterias se cultivan comercialmente por la masa celular (proteínas de células), por enzimas o por productos metabólicos, tales como ácidos o alcoholes orgánicos.

En la siguiente figura se muestra los productos metabólicos que tiene algún potencial comercial.



**Figura 2:** Productos metabólicos de interés comercial bio tecnológico



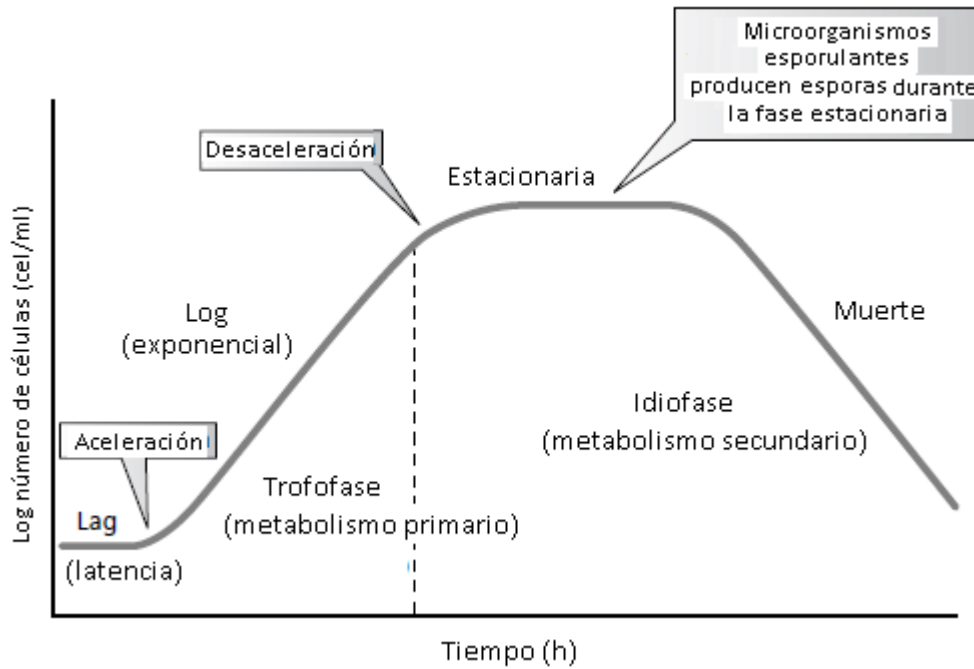
Cuando una población celular creció en un entorno que contiene cantidades ilimitadas de los nutrientes esenciales, puede asumirse que todas las células asimilan los nutrientes disponibles, producen nueva biomasa y aumentan de tamaño exactamente a la misma velocidad, bajo estas condiciones una célula puede ser tomada como representativa de toda la población. Después de cierto tiempo, esta célula representativa se dividirá produciendo dos nuevas células que son idénticas en comparación y tamaño entre sí, con la célula original.

Como no hay limitaciones de nutrientes, cada célula hija puede repetir el proceso de reproducción, con este mecanismo, la población total aumenta en forma exponencial. Cambios en las condiciones ambientales modifican las velocidades de crecimiento, sin embargo, si el microorganismo está creciendo en un sistema cerrado, la disponibilidad de nutrientes podría ser posible solamente durante cierto periodo de tiempo. En esta clase de sistema el crecimiento celular pasará a través de una serie de fases hasta que los nutrientes esenciales están agotados completamente. Dentro de cada fase la velocidad específica de crecimiento mostrará un comportamiento distinto.

La figura 3 muestra las fases típicas para un crecimiento celular en un sistema cerrado, también se muestran las velocidades específicas de crecimiento.

Durante la fase de adaptación no hay crecimiento debido a que el microorganismo está cambiando su metabolismo al crear enzimas y proteínas que necesitará para aprovechar los nutrientes disponibles, después de que el proceso de adaptación se completa la posición celular comienza a aumentar y alcanzar la velocidad máxima de crecimiento durante la fase exponencial. En la cuarta fase se observa un decrecimiento en la velocidad de crecimiento a causa del agotamiento de uno de los nutrientes. En la siguiente fase la característica principal es el balance entre las velocidades de crecimiento y la mortalidad, en consecuencia se observa una constante población celular. Finalmente en la fase última, las células viven y decrecen rápidamente debido al agotamiento completo del nutriente limitante.

La ecuación básica de crecimiento celular se deriva bajo las suposiciones que los microorganismos tienen cantidades limitadas de nutrientes y que una cinética de primer orden puede representar el proceso de crecimiento.



**Figura 3:** Fases de crecimiento y correspondientes velocidades de crecimiento

$$\Gamma_x = \frac{dx}{dt} = \mu x$$

(Smith J.M. pág. 55)

Donde  $X$  = concentración celular (g. Celular/l)  
 $U$  = Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )

La ecuación 2.8 describe el aumento en masa celular con el tiempo, pero es válido solamente cuando las condiciones ambientales externas tales como concentración de substratos, temperatura, pH son constantes, la integración proporciona.

$$L_n X = \int \mu dt + 1$$

(Smith J.M. pág. 56)

Cuando  $\mu$  es constante respecto al tiempo, la ecuación se puede integrar como sigue:

$$L_n X = \mu t + 1$$

(Smith J.M. pág. 57)



Esta ecuación depende del crecimiento celular durante la fase exponencial de la figura 2 con un  $\mu$  igual a  $\mu_{\max}$  la velocidad máxima de crecimiento se ve claramente que la ecuación 10 representa un modo muy simple de estimar  $\mu_{\max}$  a partir de un gráfico X vs tiempo, siempre ilimitados cantidades de substrato estará disponible.

En los casos en donde la velocidad de crecimiento no es constante, como en los casos de las fases de adaptación, requerirá una expresión para que la velocidad especifique el crecimiento.

### **2.3.3.1 Medición del crecimiento microbiano**

#### **1. Paso seco celular**

Un método más usado para medir el crecimiento microbiano, es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como las levaduras, esto usualmente implica centrifugación a 4-6 x 1 000 r.p.m. luego las células concentradas se colocan en un horno de 90°C durante unas 20 horas o a 105°C durante 6 a 10 horas hasta que hayan alcanzado un peso constante.

#### **2. Absorción**

Generalmente es una ventaja el hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz de modo que, la cantidad de esta que llega al detector del espectrofotómetro, está relacionado directamente con el detector del espectrómetro, está relacionada directamente con la cantidad de las células presentes en la muestra del cultivo, por lo general se emplea longitudes de onda de alrededor de 600 n.m. es importante entender que como la absorción es afectada por el tamaño y forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células, cambia si el tamaño y la forma de estas cambia durante el crecimiento del cultivo.

#### **3. Peso húmedo**

La muestra es centrifugada y filtrada a sequedad, para el pesado directo, para ello es necesario estandarizar correctamente el procedimiento



ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo que puede ocasionar errores considerables.

#### **4. Volumen de células empacadas**

Mediante la centrifugación de muestra del cultivo, en tubo de centrifugación graduado, se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas (VCE). Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

#### **5. Número de células**

El crecimiento se puede determinar también en términos del número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre porta objetos de microscopios graduados como los de Haber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto, no distingue entre células viables, es también muy agotador, sin embargo se cuenta con contadores de células automáticas.

La medición del número de células viables en el cultivo, se puede hacer diluyendo muestras del mismo, una solución salina estéril y colocando en seguida volúmenes de 0,1 ml, sobre la superficie de un medio adecuado de apoyo como el agar. Después de la incubación se puede contar el número de calorías suponiendo que cada caloría se origina de una celdilla individual. Además de requerir, este método requiere de una buena técnica de esterilización y de cuidados en la difusión de las muestras.

#### **6. Masa de un componente celular**

En el caso donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular la cuál es una cantidad constante de peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han





usado componentes como el nitrógeno, proteínas, RNA, DNA y ATP celulares.

## **7. Mediciones físicas**

El crecimiento de las células microbianas acompañadas siempre de generación de calor, recientemente se ha demostrado que existe una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método directo para birreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeño para ser medido adecuadamente.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado, que está directamente relacionado con la concentración de biomasa.

### **2.3.3.2 Factores que afectan la rapidez de crecimiento**

Los principales factores que afectan la rapidez de crecimiento, son la concentración de substratos, la temperatura, el pH y la inhibición por producto.

#### **1. Efecto de la concentración de substratos.**

MONOD, fue el primero en investigar el efecto de la concentración de substrato sobre la rapidez de crecimiento, encontró el ciclo de crecimiento procedía cuando se inoculaba medio nuevo con glucosa como única fuente de carbono y energía y con todos los otros nutrientes en exceso, es constante durante la fase exponencial. (Fig. 2), luego tiende a cero en la fase de desaceleración, donde la concentración de substratos se vuelve en saturante.

La relación entre la rapidez específica de crecimiento  $\mu$  y la concentración de substratos, es una hipérbolica, una curva de saturación similar a la que se disuelve en la cinética enzimática tipo, la ecuación para descender la curva es la siguiente:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{Smith J.M. pág. 58})$$

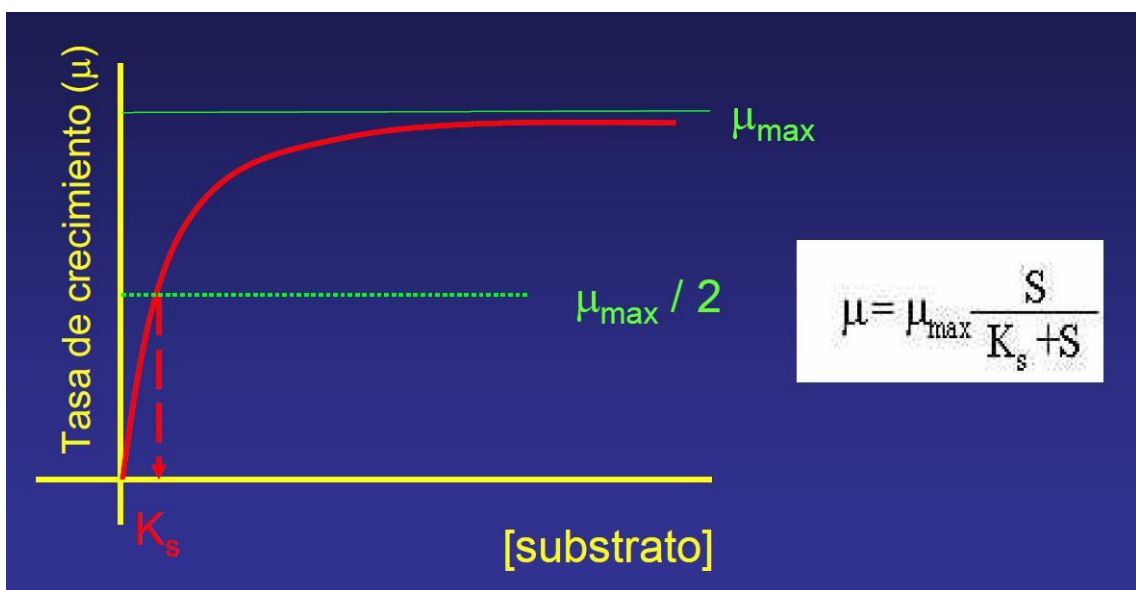
Donde:

$\mu$  = Rapidez específica de crecimiento ( $A^{-1}$ )

$s$  = Concentración de sustrato (g/l)

$\mu_{\max}$  = Rapidez específica de crecimiento rápido

$K_s$  = Constante de MONOD (g/d) que representa la concentración de sustratos que produce la mitad de  $\mu_{\max}$

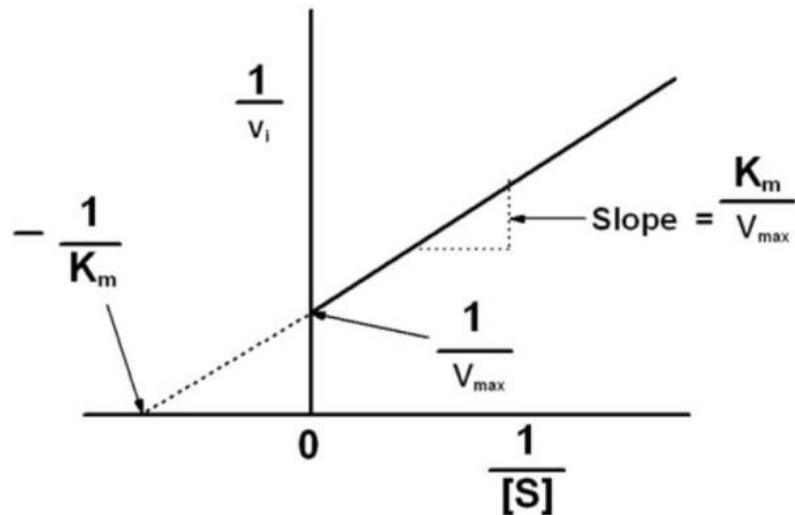


**Figura 4:** Efectos de la concentración de sustratos sobre la tasa específica de crecimiento

La ecuación se puede linealizar tomando los recíprocos para obtener la expresión siguiente:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (\text{Smith J.M. pág. 59})$$

Una gráfica de  $1/\mu$  vs  $1/s$ , produce una línea recta con pendiente  $K_s/\mu_{\max}$  abscisa al origen  $-1/K_s$  y ordenada al origen  $\mu_{\max}$  (Fig. 4)



**Figura 5:** Gráfica doble recíproco de  $1/\mu$  vs  $1/S$

## 2. Efectos de la temperatura

Como todas las reacciones químicas el crecimiento microbiano es afectado por la temperatura, el crecimiento se describe por:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \alpha x$$

(Smith J.M. pág. 59)

Donde:

$\mu$  = Rapidez de crecimiento específico (h-1)

$\alpha$  = Rapidez específico de muestra (h-1)

Los microorganismos están divididos arbitrariamente en tres clases diferentes de la temperatura para su crecimiento. Estas clases son los sicrófilos (mayor de 29°C), mesófilos (30 – 37°C) y termófilos (más de 38°C)

Las curvas de  $\mu$  vs temperatura tienen formas similares para las tres clases, con  $\mu$  duplicándose para cada elección aproximadamente de 10°C de



temperatura, el crecimiento y la mortalidad se pueden describir por la relación

$$\mu = A^{\circ} e^{-E / RT} \quad (\text{Smith J.M. pág. 63})$$

$$\alpha = A^{01} e^{-E' / RT} \quad (\text{Smith J.M. pág. 64})$$

Donde:

$A^{\circ}$  y  $A^{01}$  = Son constantes

$E$  y  $E'$  = Son las energías de activación

$R$  = Constante de los gases (1,98 cal mol / K)

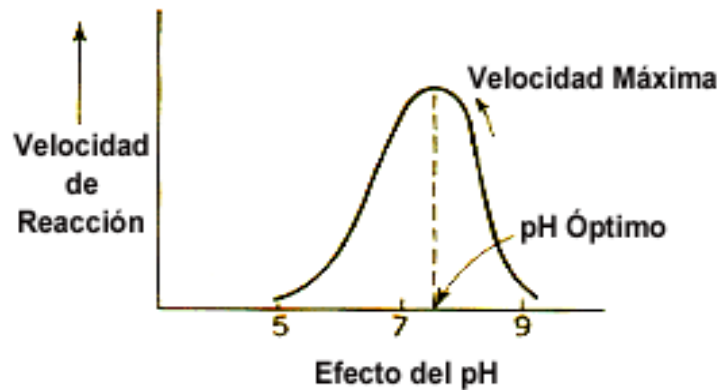
$T$  = Temperatura absoluta (K)

Los valores típicos para  $E$  y  $E'$  son de 15,20 Kcal/mol, y 60 – 70 Kcal/mol, respectivamente.

### 3. Efectos del pH

El pH es un parámetro importante del crecimiento celular. Para la mayoría de las bacterias el pH óptimo cae en el intervalo 6,5 a 7,5 con algunas excepciones por debajo de 5,0 y por encima de 8,5 el crecimiento no es posible.

El pH influye en la actividad de la membrana celular, en el aprovechamiento del sustrato y la formación por el producto



**Figura 6:** Efectos del pH sobre  $\mu_{\max}$

La membrana celular no solo separa los contenidos del interior de las células del entorno exterior, sino que también controla el flujo de material de y hacia el interior de la célula. Parte de los mecanismos de control depende de los gradientes de pH. Entonces si el pH extracelular está cambiando, la membrana tiene que modificar de algún modo sus mecanismos de transporte para mantener constante el pH intracelular.

Es bien conocido que los cambios de pH afectan el aprovechamiento del sustrato y la formación del producto, debido a que el pH tiene más influencia fuerte en el metabolismo. La curva típica se muestra en la fig. 5, la relación  $\mu_{\max}$  vs pH ha sido descrita empíricamente por curvas similares a la ecuación 13.

$$\mu_{\max} = \alpha_0 + \alpha_1\text{pH} + \alpha_2\text{pH}^2 + \alpha_3\text{pH}^3 \quad (\text{Smith J.M. pág. 67})$$

### 2.3.3.3 Modelos de crecimiento

Los modelos matemáticos de crecimiento celular pueden ser dosificados en modelos estructurados, estructurados al primer modelo representa a la población celular total por una única célula promedio cuyo contenido puede ser descrita estudiando el medio ambiente en el que se encuentra la célula en crecimiento. Los modelos no estructurados no pueden reconocer que la célula sea capaz de alternar su metabolismo en respuesta del cambio ambiental.

En consecuencia estos modelos no estructurados no pueden producir diferencia en la composición celular y formación de productos en las distintas fases de crecimiento.

Los modelos estructurales son mucho más complejos que los no estructurales, debido a la inducción de eventos dentro de la célula, tales como interrogaciones de mecanismos metabólicos y estructuras internas.

Estos modelos pueden hacer predecir incluso cuando las capacidades metabólicas de las células están cambiando. Un modelo no estructurado bien conocido es el siguiente:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_0 + S} \quad (\text{Smith J.M. pág. 67})$$

El modelo ha sido aplicado tanto en la fermentación batch (discontinuo) como la fermentación continua y para gran número de microorganismos. Se han propuesto varias alternativas de modelos de MONOD por ejemplo:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} (1 - \theta^{S/K_g}) \quad (\text{Smith J.M. pág. 75})$$

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left( \frac{S^n}{K_1 + S^n} \right) = \mu_{\text{máx}} \left( \frac{S}{K_0 X + S} \right) \quad (\text{Smith J.M. pág. 77})$$

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left[ \frac{S}{(K_0 + K_d) + S} \right] \quad (\text{Smith J.M. pág. 79})$$

Donde:

$K_d$  = Factor que tiene en cuenta la permeabilidad de la pared celular, difusión de substrato y tamaño de la célula.

Una comparación de modelos ha demostrado que en una región experimental dada, los modelos dan resultados no muy diferentes, por tanto, aquellos con un número mínimo de parámetros son preferidos.

### 2.3.4. Materias primas

#### ❖ Melaza

La melaza es el jarabe madre final de la cristalización del azúcar, en la fabricación del azúcar de caña o de remolacha, contiene alrededor de 50% de sacarosa lo cual no puede ser cristalizado por los procedimientos usuales debido a la acumulación de sustancias no azucaradas que impiden una mayor cristalización.

La melaza es un líquido espeso pardo necrosis, su densidad es de 15cp. La composición de las melazas no es igual, pues, todas ellas presentan una gran variedad debido a muchos factores, tales como la calidad de la caña, estado de maduración, formas del trabajo en los ingenios e instalaciones de cada fábrica, etc.

**Tabla 3:** Composición promedio de la melaza

Sustancias	% Peso
Sacarosa	50,00
Azúcares reductores	12,00
Sustancias nitrogenadas	3,00
Ácidos libres	2,00
Ácidos combinados	3,00
Cremas solubles	2,00
Agua	20,00
Ceniza	8,00
<b>Total</b>	<b>100,00</b>

**Fuente:** Biotecnología de la alimentación (García G. 1993)

Las sustancias nitrogenadas están constituidas en general por aminoácidos y materias albuminoideas degradadas.

Los ácidos que se hallan presentes son generalmente, ácido tartárico, ácido cítrico, láctico y acético.

Las cenizas contienen potasio, calcio, magnesio, hierro, etc.



### 2.3.5. Levaduras o enzimas

Resulta un tanto difícil exponer cuales son los microorganismos que se consideran levaduras desde el punto de vista botánico, bioquímico o técnico. El concepto de levadura como microorganismos unicelulares que se reproduce por general y son capaces de transformar el azúcar en alcohol etílico y anhídrido carbónico, ya no es satisfactorio.

Actualmente se considera levadura a una serie de microorganismos que antes se contaban entre los hongos filamentosos por su morfología o su propiedad fisiológica en proporcionar una mayor similitud con las levaduras.

Los verdaderos microorganismos fermentativos encuentran aplicaciones en la industria, en la obtención de bebidas fermentadas como la cerveza, vino, aguardiente, sidra y similares en la fabricación de etano y otros alcoholes, en la obtención de ácido orgánico, sobre todo los ácidos acéticos y lácticos, en pequeña proporción en la producción de aldehídos y cetonas.

Al observar la preparación de levaduras a través del microscopio se vé según el tipo de levadura, un sinfín de semillas esféricas, elípticas, cilíndricas i en forma de salchichas, que se hallan aislados o unidas entre sí en cadenas cortas, la forma de las células es muy variable en las diferentes especies y a veces en la misma especie, pero aun así es necesario conocer las diferentes formas que pueden presentar la especie o especies de levaduras que se utiliza ya que por medio de la observación microscópica se determina si la levadura ha sido impurificada o contaminada por otros microorganismos.

Al igual que otras células vegetales, la célula de levadura se halla formado por el citoplasma, núcleo y membrana celular.

El citoplasma ocupa la parte interna de la célula y se halla formado por un líquido viscoso compuesto de agua y albuminoides, en el citoplasma se encuentran las vacuolas, las granulaciones, la grasa y los hilos que suspenden las granulaciones, las células de la cerveza sintetizan unos compuestos orgánicos que se denominan “enzimas” las células se caracterizan por la acción catalítica, estos catalizadores orgánicos se diferencian de los catalizadores inorgánicos, en que se destruye en forma irreversible, por acción de sustancias tóxicas a diversas enzimas o el medio ambiente negativo, por lo que se tiene que formar de nuevo esta enzima cuando son destruidas, en cambio en su acción catalítica,





son iguales a los catalizadores inorgánicos, ya que actúan también en catalizadores pequeñísimos.

La propiedad más característica de las enzimas es su especificidad, ya que cada enzima una determinada reacción, por ejemplo, la enzima desdobra la maltosa y no actúa sobre la sacarosa.

La acción enzimática se ve favorecida por temperaturas comprendidas entre 35 y 40°C, sin embargo cada enzima generalmente se destruye, quedando inactivas de forma irreversible.

La concentración de iones hidrogeniones o pH, también es de gran importancia en la acción enzimática ya que cada enzima posee un rango en el cual actúa más eficazmente.

### **2.3.5.1. Clasificación de las enzimas**

Se clasifican en dos grandes grupos:

#### **a) Hidrolazas**

Que ocasiona la incorporación del agua y el desdoblamiento de las moléculas por hidrólisis, por ejemplo, la invertasa que desdobra por hidrólisis la sacarosa en glucosa y fructuosa.

#### **b) Desmolazas**

Son aquellos que catalizan la degradación definitiva y total de las sustancias incorporadas por la célula y distribuidas por las hidrolazas. Durante este proceso no solo se rompen uniones entre carbono y oxígeno, sino que también se destruyen combinándose entre átomos de carbono, por ejemplo la zimasa destruye la glucosa y la fructuosa para dar el alcohol etílico y anhídrido carbónico.

### **2.3.6. Operaciones y procesos**

En la fermentación de la sacarosa, para obtener alcohol etílico se emplean las siguientes operaciones y procesos:



## OPERACIONES UNITARIAS

- Flujo de fluidos
- Transmisión de calor

En la fermentación del mosto se consideran dos partes fundamentales:

La presentación del mosto y la fermentación, para realizar este trabajo se toma como base la producción de 7 litros de alcohol.

### 2.3.6.1 PREPARACIÓN DEL MOSTO

La sacarosa necesita ser acondicionada previamente para poder fermentar en forma eficiente y que se denominará mosto.

El mosto es preparado en forma específica por los cultivadores, pre fermentado y fermentado ya que cada uno de estos tanques desempeña una función diferente. Los cultivos y pre fermentador que tienen por función preparar el cultivo de levaduras preparado en el laboratorio, es por ello que el mosto dedicado a estos depósitos es preparado en forma tal que facilita la reproducción del cultivo de levaduras, en cambio el mosto que se emplea en el fermentador es preparado para ser fermentado de todo el azúcar que contiene, en forma eficiente.

Las condiciones que necesita el mosto para poder fermentar son: Concentraciones de azúcares, concentraciones de iones hidrogeniones o pH presentado en sales naturales, temperatura y oxígeno.

#### a) **Concentraciones de azúcar**

Las concentraciones de azúcar fermentables (sacarosa) en el mosto deben ser entre 16 – 17 % como máximo a fin de que se produzca por la fermentación una concentración de 9 – 10 % de alcohol etílico. Una mayor concentración de azúcar daría lugar a una fermentación incompleta debido a que el proceso de fermentación se paraliza cuando el alcohol etílico producido alcanza la concentración del 12% que provoca efecto adverso en el crecimiento y la capacidad fermentativa de la levadura.



Para obtener la concentración deseada, la sacarosa es diluida con agua. En las destilaciones la disolución de la sacarosa se regula por medio de los “Brix”, los cuales miden la concentración de sólidos disueltos (azúcar) en una solución.

#### **b) Concentraciones de iones hidrogeniones o pH**

La relación enzimática de la levadura es influenciada en forma decisiva por la fermentación de iones hidrogeniones o pH que tiene el medio.

Para la fermentación óptima del mosto, este debe tener un pH de 4,9 a 5,0 que es el más adecuado para esta fermentación.

Para alcanzar este pH, se agrega al mosto, ácido sulfúrico industrial.

#### **c) Sales nutritivas**

Como todo organismo viviente, la levadura necesita e sustancias alimenticias que son absolutamente necesarias para su desarrollo normal, ya que a partir de ellas forma todas las combinaciones orgánicas que necesita para su función celular, tales sustancias son el agua, carbono, nitrógeno y materiales minerales.

El agua, carbón y materia inorgánica se hallan en el mosto, los azúcares son buenas fuentes de carbono para las levaduras. El nitrógeno también se halla en el mosto en forma de compuesto, pero en la fermentación del azúcar de caña se les trata de eliminar, por lo que es necesario agregar sales nitrogenadas al mosto que se va a emplear en la producción de la levadura para reproducirse. Estas sustancias nitrogenadas dan lugar a aminoácidos que sirven para la alimentación de las levaduras.

En la preparación del mosto se agrega para ello sulfato de amonio que sirve para proveer de sustancias nitrogenadas al mosto para que la levadura se nutra.

#### **d) Temperatura**

La temperatura es otro factor que influye decisivamente en la acción enzimática de las que puedan actuar, cuando sobrepasan dichas zonas, que generalmente es de 37 a 40°C, las enzimas se distribuyen en forma irreversible provocando la detención del proceso fermentativo.



La temperatura máxima que debe observarse en la fermentación del mosto de la sacarosa es de 40°C.

#### e) Oxígeno

El crecimiento de la levadura se realiza en forma rigurosa, cuando se halla presente el oxígeno, es por ello que en los cultivadores y los pre fermentadores, se agita el mosto por medio de aire para así oxigenar la masa y permitir una buena propagación de la levadura.

#### f) Esterilización

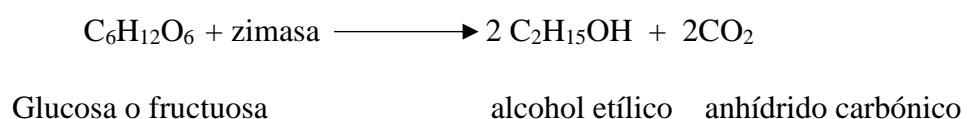
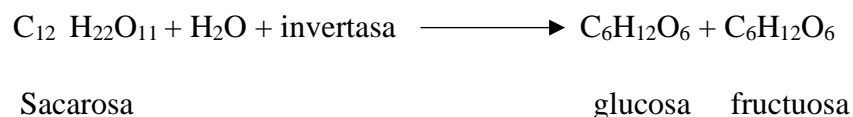
Es otro aspecto importante en la fermentación del mosto, tiene como misión obtener únicamente la fermentación de productos indeseables, debido a la contaminación causada por microorganismos externos. La esterilización del mosto es realizado en el fermentador.

#### g) Preparación del mosto para el fermentador

Primero se llena el tanque de mosto, luego se añade agua hasta que se tenga una mezcla de 27 ° Brix, este mosto se mezcla en el tanque fermentador que previamente ha sido lavado, esterilizado durante 20 minutos de llenado el mosto, se agrega la cantidad de 250 g. de levadura, controlando el pH que debe estar en un rango de 4,9 a 5,0

### 2.3.7. Fermentación

Luego que se llena el fermentador, que va a emplearse con el mosto preparado e inoculado en el cultivo o iniciador, comienza el proceso de fermentación de la sacarosa, la cual se produce de acuerdo a la siguiente reacción:





Donde la sacarosa es transformada en alcohol etílico y anhídrido carbónico por la inversión que se produce por la acción de la enzima inversa, es una hidrolasa, la que por hidrólisis desdobra la sacarosa en los monosacáridos glucosa y fructuosa, luego estos monosacáridos son transformados en etanol y anhídrido carbónico por acción de la enzima zimasa.

La fermentación del mosto dura aproximadamente 48 horas, durante los cuales la temperatura sube, como la temperatura debe mantenerse en 37°C para evitar la destrucción de las enzimas, se refiere mediante una película de agua que corre por el exterior del tanque o por medio del serpentín y la chaqueta tratando de mantener los 37°C en todo momento.

### **2.3.8. Rendimiento del fermentador**

Se tiene que disponer de los siguientes datos:

- Cantidad de sacarosa utilizada
- % de azúcar inicial y final
- % de alcohol en el mosto
- Volumen de mosto destilado

Procedimiento:

1. Se determina la cantidad de melaza utilizada en el fermentador y el azúcar que contiene.
2. Se determina la cantidad de azúcar reducida y luego el azúcar fermentada.
3. Azúcar reducida =  $(\% \text{ laboratorio} * \text{volumen}) / 100$
4. Azúcar fermentada = Azúcar inicial – Azúcar residual.
5. Determinar los litros absolutos de alcohol teórico y producido.
6. Eficiencia =  $(\text{litros absolutos de alcohol en el mosto}) / (\text{litros absoluto de alcohol teórico})$

### **CONTROLES A REALIZARSE EN LA SACAROSA**

- Determinación del °Brix
- Determinación del azúcar
- Determinación de pH y acidez
- Determinación del alcohol etílico



### 2.3.9. Bio-reactor

El bio-reactor es un recipiente en donde se desarrolla procesos bioquímicos, al cual se deberá proporcionar de un medio ambiente aséptico en el que únicamente se encuentran los microorganismos deseados.

Para el funcionamiento de cualquier bio-reactor, se deben tener las condiciones necesarias para su esterilización y mantener la asepsia, debe contar con dispositivos que permitan el suministro de sustratos o de nitratos, un control adecuado de temperatura y pH adecuado, niveles apropiados de oxígeno disuelto, evacuando los productos y sub productos, y una buena agitación que permita mantener las condiciones uniformes en todo el reactor.

El diseño de un bio-reactor es específico para cada proceso biológico y su complejidad depende de los experimentos de proceso, por tanto un sistema no debe ser más complicado de lo que resulta ser necesario.

#### 2.3.9.1. Semejanza y diferencia entre reactores y bio-reactores

En la tabla (4) se muestra las semejanzas y diferencias entre reactores químicos y bio-reactores.

**Tabla 4:** Semejanzas entre reactores y bio-reactores

<b>Características</b>	<b>Reactor</b>	<b>Bio - reactor</b>
- Proceso - Control del proceso	- Químico - Presión, temperatura, pH, concentración.	- Bio – químico - Temperatura, Ph, presión, concentración de O <sub>2</sub> , control de espuma.
- Material de construcción	- Variado de acuerdo a los requerimientos del proceso	- Acero inoxidable, porcelana, vidrio.
- Limpieza	- No es necesario que esté estéril	- Esterilización.

**Fuente:** Elaboración propia



### 2.3.9.2 Principales tipos de bio - reactores

Para los procesos biológicos se pueden emplear varios tipos de bio-reactores y su grado de sofisticación en cuando al diseño, construcción y funcionamiento, vienen determinados por la sensibilidad del proceso, al ambiente mantenido en el recipiente.

Hay tres grupos de bio-reactores usados actualmente para la producción industrial.

1. No agitados, sin aeración (86%).
2. No agitados, con aeración (11%).
3. Agitados, con aeración (13%).

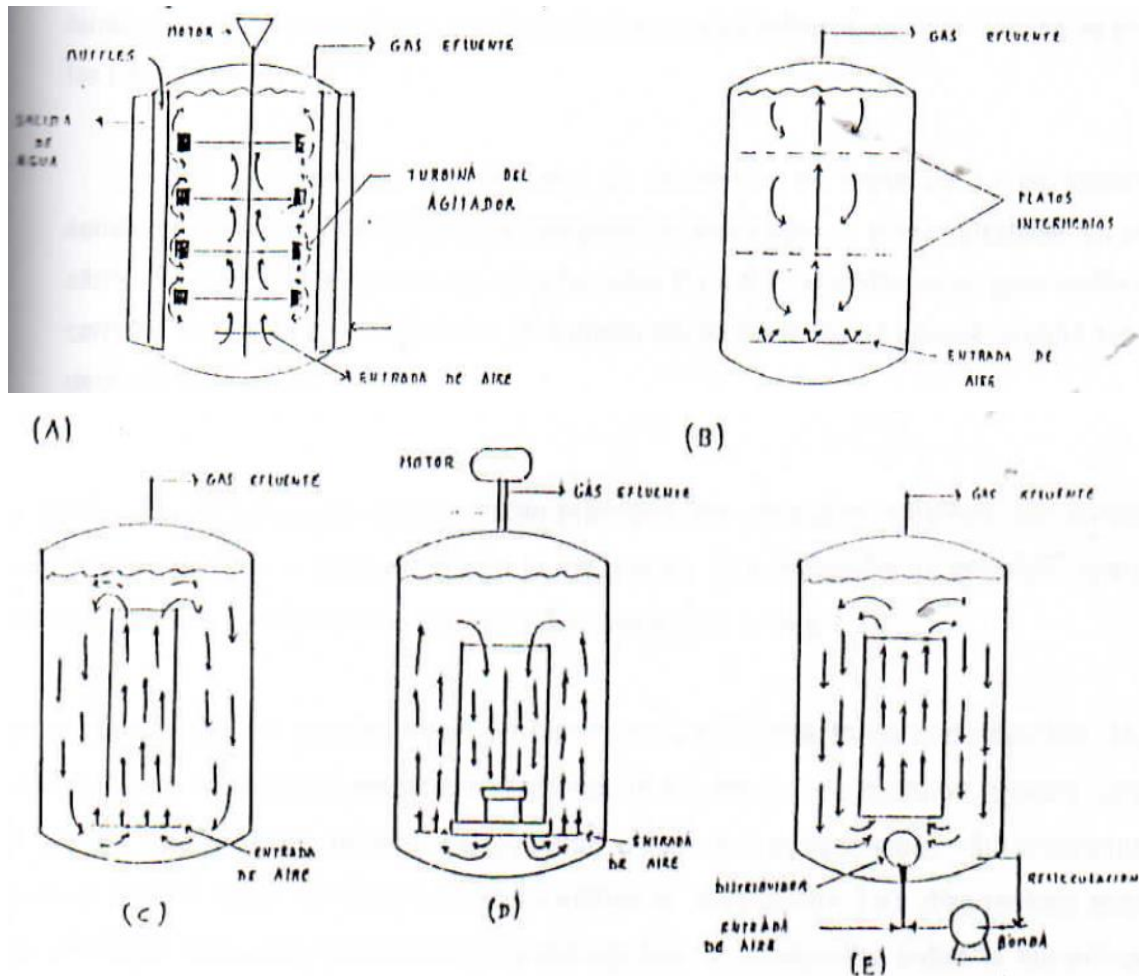
Según el tipo de cultivo se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- a) Sistemas de cultivo disperso.
- b) Sistemas de cultivo movilizado.

Los microorganismos se encuentran inmersos en el medio de cultivo y según los movimientos de nutrientes logrados. En este grupo se tienen los siguientes reactores:

- I. Reactores de tanque agitado.
- II. Bio-reactores de elevación.
- III. Reactores de circuito.

Los reactores con aeración y agitados, son difíciles de escalar, pero generalmente son seleccionados para sintetizar nuevos productos que requieren el crecimiento de microorganismos. A continuación se presentan los diversos tipos-reactores.



**Figura 6:** Bio – reactor (A) tanque agitado, (B) columna de burbujas, (C) aireador con tubo central, (D) de circuito (E) de inyección

### 1. Bio- reactor tipo tanque con agitación

Los fermentadores de tanque agitados (Fig. 3.1 – A) mantienen un sistema homogéneo mediante agitación de mecánica que provoca una adecuada dispersión y mezclado de los materiales inyectados consiguiéndose una mejor transferencia de calor para mantener la uniformidad de la temperatura, y una rápida disolución de los gases burbujeados, tales como el oxígeno contenido en el aire.

Los bio-reactor consiste normalmente en un cilindro vertical con fondo esférico, lo que facilita el drenaje del líquido cuando se descarga el medio por el fondo, mientras que la parte superior tiempo que el líquido condensado en la salida de los gases vuelve a caer dentro del fermentador, los extremos curvos son normalmente semiesféricos, aunque también se emplean los hemisféricos.





Todos los bio-reactores de tanque agitado están provistos de mamparas o baffles que evitan la formación de un gran vértice central y mejoran el mezclado. Generalmente se instalan cuatro mamparas con una relación de anchura a diámetro del reactor de 1:10 a 1:12.

La formación de espuma es a menudo un problema en los bio-reactores con aeración. No siempre se puede añadir anti-espumante para disminuir la formación de espuma, puesto que pueden tener efectos de inhibición sobre el vencimiento de los microorganismos. Sin embargo, simples tienen rastrillos montados sobre la flecha del agitador y localizados sobre la superficie del líquido. La solución de nutriente contenido en la espuma fluye de nuevo hacia el bio-reactor y el aire liberado de la espuma sale del recipiente.

Debe haber un número mínimo de aberturas en el bio-reactor para que pueda mantenerse la esterilidad. Se puede hacer pequeñas aberturas a prueba de fugas con anillos en O y las aberturas grandes se pueden ajustar con juntas. Una de las áreas más difíciles de sellar efectivamente es donde la flecha del agitador pasa hacia el recipiente. Aquí se debe ajustar con un sello mecánico doble. Si son posible las uniones de todas las partes conectadas con el recipiente estéril, como también, las de las tuberías dentro y fuera del bio-reactor deben soldarse. No debe haber ninguna conexión directa entre el aire no estéril y la estéril, es decir, los dispositivos de muestra y los puntos de inyección deben estar contenidos en compuertas esterilizables con vapor.

El agitador consiste en una o más palas mecánicas que giran sobre un eje suspendido en la parte superior del bio-reactor a través de la cual entra el eje constituye un riesgo de contaminación entre el recipiente y la atmósfera.

La finalidad de la agitación en un bio-reactor es:

- a) Dispersar el aire en la solución de nutrientes;
- b) Obtener una temperatura y una concentración de nutrientes en todo el recipiente;
- c) Dispersar cuales quiera de los líquidos inmiscibles presentes.

Cuando están presentes sólidos, como en una fermentación, se encuentra que es útil un componente axial para mantener los sólidos en suspensión, por lo que se usa una turbina de paletas con un anulo de paleta de 35°.



El gas bajo presión es suministrado al aspersor, usualmente un anillo con huecos o un tubo con un solo orificio, el cual debe tener un sistema de drenaje. El impedir corta las burbujas y las dispersa a través del tanque asegurando de este nutrientes sólidos, y además acelera la velocidad de intercambio entre los gérmenes y el medio ambiente y proporciona un contacto adecuado gas – líquido.

Demasiada agitación puede ser perjudicial debido a la sensibilidad al cizallamiento de corte exhibido por algunas células. Los impeller, predominantemente escogidos con los de disco y turbina, mientras que las paletas son importantes para sistemas celulares de sensibilidad al cizallamiento.

Para conseguir la turbulencia necesaria para la mezcla, transferencia de calor y dispersión de los gases se utilizan generalmente cuatro deflectores (baffles) unidos o próximos a las paredes del recipiente.

Las principales ventajas de estos bio – reactores son: La flexibilidad y la capacidad de proveer altos coeficientes de transferencia de masa.

Los bio-reactores de tanque con agitación son utilizados para producción de antibióticos y en forma comercial para suspensión de altas viscosidades.

Para bio-reactores de gran capacidad, las principales limitaciones en cuanto a su tamaño son: un adecuado suministro de oxígeno y remoción eficiente del calor metabólico, mediante serpentines internos o chaquetas de enfriamiento. Por otro lado, si la espuma escapa del recipiente podría humedecer los filtros aumentando la presión y reduciendo el flujo de gas, además de proporcionar una vía para los contaminantes.

## **2. Bio- reactores de elevación con aire**

La falta de patrón de flujo bien definido en un reactor tipo tanque con agitación ha conducido a la creación de un reactor basado en el principio de lazo. La cantidad de aire necesario para la reacción biológica usualmente es suficiente para actuar como la única fuente del movimiento del líquido. El aire de proceso se introduce en el fondo del tubo ascendente, en donde la flotación de las burbujas ascendentes ejercen una fuerza de arrastre sobre el fluido circundante que sería el medio por el tubo. En la parte superior, la pequeña porción es transportada hacia el tubo de descenso de manera que en esta región hay solo un aporte mínimo de oxígeno y poco arrastre hacia arriba.



Las principales ventajas de los bio-reactores con elevación con aire, comparados con los bio-reactores de tanque agitado, son el escaso requerimiento de energía relativamente bajos y construcción más simple, ya que no se necesitan sellos asépticos alrededor de la flecha del agitador.

Las desventajas a gran escala, especialmente a gran escala, son los altos costos de capital, dificultad de esterilización y mayores costos de energía. Aunque los requerimientos de energía son menores, la comprensión de aire para el mezclado y el transporte de la biomasa es menos eficiente debido a que el motor del agitador usa energía eléctrica.

Los bio-reactores de elevación con aire pueden clasificarse en bio-reactores de columnas de burbuja y reactores de circulación.

En los bio-reactores de columnas de burbuja, el gas se introduce por el fondo de la columna a través de una abertura, un disco perforado o un filtro. Estos reactores normalmente son altos, cuenta con unos deflectores horizontales, que ayudan a dispersar las burbujas de gas ascendentes mientras que las camisas o de serpentines de enfriamiento permiten mantener la temperatura a lo largo del recipiente.

El uso de las columnas de burbujas es limitado, debido a que trabajan sobre un rango muy estrecho de flujo de gas para evitar la formación de espuma, la coalescencia de burbujas y sobre pasar el límite a partir del nivel, parte del líquido saldría del recipiente arrastrado por la corriente de gas.

Los reactores de circulación tienen características intermedias entre las columnas de burbujas y los reactores de tanque agitado. En el sistema AIRLIFT, el movimiento del gas eleva el fluido y las células hacia el tubo de aspersión. En la parte superior del tubo, el gas se desprende del líquido y el líquido sin gas (el cual es más denso que el líquido con gas) desciende por la parte exterior del tubo. En la parte inferior del reactor, el fluido se encuentra nuevamente con la corriente de gas y es elevado por el tubo de aspiración. Se pueden adicionar un sistema de agitación mecánica para aumentar la amplitud del rango de operación de este sistema o una bomba para la recirculación e inyección del gas.

En la tabla 5 se dan algunos datos de mezclado para columnas de burbujeo y reactores de elevación con aire de distintos tamaños. Se puede observar que para tener

una homogeneidad del 95% es necesario recorrer seis veces el reactor después de la aplicación de un pulso de ácido.

**Tabla 5:** Datos de mezclado para la columna de burbujeo y reactores de elevación con aire

Tipo de reactor	Volumen del reactor	Tiempo de circulación	Tiempo de mezclado
Columna de burbujas	2	-	18
	28	-	80
Elevación con aire	0,4	10	63
	2,0	14	80
	27,0	17	101

*Fuente:* “Biotecnología para ingenieros” (Scragg A. 1986)

### 2.3.9.3 Sistemas de cultivo inmovilizado

El micro organismos se desarrollas en forma de una lámina o cepa dispuesta sobre una superficie que está en estado con el medio nutriente. Los sistemas de cultivo inmovilizado se llevan a cabo en los siguientes reactores.

#### 1. Bio-reactor de filtro fijo

Las películas microbianas se desarrollan sobre la piedra, piezas de plástico o láminas de plástico onduladas a través del cual se desplaza el medio de cultivo para que entre en contacto con la capa microbiana de la superficie.

Las columnas empaquetadas son las más utilizadas ya que son fáciles de operar y automatizar, además de proporcionar altas velocidades de transferencia de masa.

Debido a que el producto es eliminado continuamente del reactor ya que normalmente no se alcanzan concentraciones críticas, se aconseja usarlas en el caso de inhibición por producto, más no en el caso de inhibición por sustrato ya que la concentración del sustrato disminuye desde el nivel de entrada al de salida.

Los reactores de lecho fijo presentan algunos problemas como: mantener constante la temperatura y el pH, así como el suministro de reactivos gaseosos,



para lo cual se utiliza en algunos casos, circuitos de circulación. Por otra parte las columnas pueden comprimirse y atascarse el flujo y el mantenimiento de las condiciones higiénicas.

## **2. Reactores continuo de tanque agitado.**

Los reactores agitados consisten en un tanque agitado al que se le suministra sustrato a la misma velocidad con la que se eleva el contenido del reactor.

Como la agitación es buena, la concentración del reactivo es uniforme dentro del recipiente y el fluido que sale del reactor tiene la misma composición que la mezcla dentro del tanque. Los reactores continuos de agitado resultan económicos, versátiles y especialmente adecuados para llevar a cabo reacciones en fase líquida. El suministro de gas, el pH, la temperatura se puede controlar fácilmente, la desventaja consiste en que, al requerir alto flujo de entrada que proporcione la necesaria agitación, se deteriora las particularidades del biocatalizador.

## **3. Bio-reactores de lecho fluidizado**

En la última década se ha registrado un aumento significativo en el número de sistema, de reactor de lecho fluidizado, las cuales se han usado principalmente para células inmovilizadas sobre un material particular. Si la densidad de partículas es mayor que la del agua, el bio-reactor se puede disponer como en la figura 6, en el cual se ajusta un lazo externo a un reactor común. Esto tiene la ventaja de que se puede usar una densidad de partículas mayor y que la velocidad de flujo requerida para la fluidificación se puede alcanzar independientemente del resto del reactor. Las partículas con menor densidad que la del agua se puede mantener en suspensión usando el flujo de aire de un reactor aeróbico, para reducir la densidad del flujo y por tanto, la flotación de las partículas, como se muestra en la Fig. 7.

En los reactores de lecho fluidizado, las partículas del biocatalizador se mantienen en suspensión al pasar el sustrato o un gas, en flujo ascendente de alta velocidad, lo que permite conseguir una mezcla y una población estable de células vivas en todo el reactor. Por consiguiente estos reactores tienen características tanto de sistemas de cultivo disperso, como de cultivo inmovilizado. Las

partículas de soporte pueden ser sólidas tales como arena, perlas de vidrio, mallas de plástico o de acero inoxidable; sin embargo no son necesarias para los microorganismos que forman grandes masas flotantes.

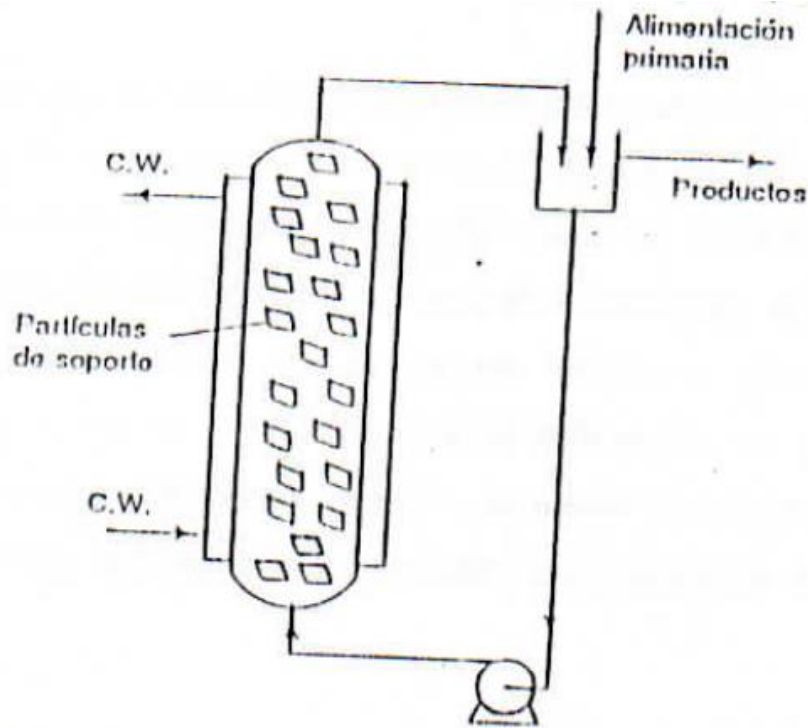
**VENTAJAS:**

- Características superiores de transferencia de masa y calor.
- Provocan un mezclado adecuado éntrelas tres fases, evitando que se bloquee el medio sólido o que se produzcan pérdidas de biomasa por el lavado en los cultivos continuos de crecimiento.
- Requerimiento de energía relativamente bajos.
- Bajas velocidades de cizallamiento o corte lo cual hace que el reactor del lecho fluidizado sea adecuado para las células sensibles al corte, tales como células de mamíferos y plantas

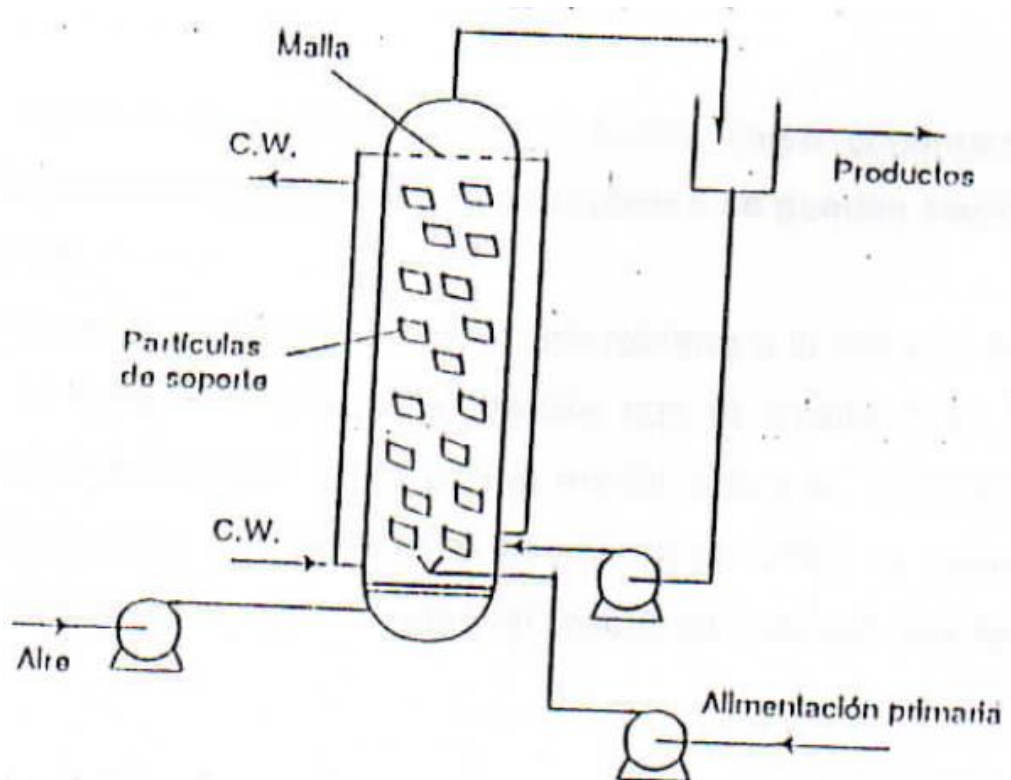
**Tabla 6:** Sistema de bio-reactores de lecho fluidizado y algunas aplicaciones

<b>Volumen del bio-reactor</b>	<b>Sistema celular</b>	<b>Productos obtenidos</b>
0,166 L.	S. Cereviseae	Etanol
10,0 L.	S. Cereviseae	Etanol
10,0 L.	Trichoderma Polysponim	Ciclopurina A
13,0 L.	Inmovilised Z	Etanol
1 000 y 2 000 L.	Mobilis-levaduras	Etanol
Escala industrial	Lodo activado	Tratamiento de aguas residuales

**Fuente:** “Biotecnología para ingenieros” (Scragg A. 1997)



**Figura 7:** Reactor de lecho fluidizado (C.W. agua fría)



**Figura 8:** Reactor de lecho fluidizado para partículas con una densidad más baja que el agua



### **2.3.10. Operaciones de los reactores tipo tanque.**

Para operar los reactores tipo tanque, se tiene que tener en cuenta que la reacción se lleva a cabo en un sistema continuo o en sistema por pragas (intermitente, batch)

#### **2.3.10.2 Operación por cargas o Batch**

Se carga el reactor con los reactantes de manera que a medida que la reacción transcurre, las condiciones dentro del reactor cambian consumiéndose los substratos y nutrientes, formándose los productos, cuando se alcanza el grado deseado en la reacción se descarga el reactor y se carga nuevamente para repetir el proceso.

La principal desventaja de esta operaciones la gran cantidad de tiempo que se pierde en el bio-reactor por cargas y descargas, la dificultad en el diseño. La variabilidad de un proceso a otro, la demanda desigual de suministros energéticos y de mantenimiento, y la acumulación en el proceso de productos inhibidores. Las principales ventajas, disminución de los riesgos de contaminación, la gran flexibilidad de operación debido a que los fermentadores pueden utilizarse para la fabricación de varios productos diferentes, la posibilidad de llevar a cabo diferentes fases sucesivas en el mismo equipo, la mejor coordinación con los pasos previos y subsiguientes del proceso, así como la posibilidad de mantener un organismo en una fase de cultivo decadente.

#### **2.3.10.3 Operación continua**

Los reactivos ingresan al reactor y los productos salen continuamente, el sistema de operación continúa de acuerdo al tipo de comportamiento se pueden clasificar en:

##### **a. Flujo pistón**

El medio nutriente se inocula con el cultivo microbiano a la entrada del reactor llevando los microorganismos, su actividad biológica a medida que el líquido fluye a través del sistema, sabiendo los productos del reactor junto con el medio utilizado, los microorganismos pueden separarse de los productos y reciclarse para inocular la corriente de entrada, en un sistema de flujo pistón, cada





elemento se comporta como un reactor por cargas que se mueve a lo largo del sistema.

### **b. Mezcla perfecta**

Las unidades son teóricamente uniformes en todo el reactor en el que existe un equilibrio entre los nutrientes, los organismos y los productos, entre los componentes que entran al sistema no se incluyen los microorganismos a no ser que se introduzcan al inóculo, la salida del reactor consiste en una mezcla en equilibrio que sale a una velocidad tal, que la pérdida del organismo a la salida se compensa con los que se añaden o con los que crecen en el fermentador, así es necesario determinar un adecuado tiempo de residencia hidráulica, teniendo en consideración que algunos elementos pasarán directamente de la entrada a la salida llevando nutrientes que han sido consumidos mientras que otros permanecerán en el reactor más tiempo del necesario.

En general las ventajas de los sistemas continuos es el menor tiempo de residencia, y el menor tiempo que el reactor permanece improductivo, la menor acumulación de productos inhibidores, se adapta mejor a los procesos asociados con el crecimiento. Las desventajas son el mayor riesgo de contaminación, la dificultad de establecer un tiempo de residencia hidráulica moderado.

#### **2.3.11. Selección del equipo**

Para tomar la decisión del diseño y construcción de un fermentador tipo tanque agitado para el laboratorio, se tomó en cuenta los múltiples que puede tener este equipo, el cual presenta las siguientes ventajas:

- a. Los componentes del medio de fermentación presentan la misma composición en un tiempo determinado, de esta manera se aproxima al reactor ideal de mezcla perfecta.
- b. Permite regular y controlar más fácilmente los parámetros durante el proceso de bio-transformación.
- c. Disminuye los riesgos de contaminación ya que el tanque puede vaciarse, limpiarse, esterilizarse y recargarse antes de cada operación.
- d. Permite un pre-tratamiento de las materias primas.



- e. Podrá ser usado para evaluar y seleccionar el medio del cultivo a usar en cada caso.

El reactor tipo tanque agitado de operación intermitente, es seleccionado por las ventajas que presenta, para la fermentación de melaza a las condiciones de laboratorio de procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA – Puno. Lo mismo que para la fermentación de jugo de naranja y piña, y como reactor para obtener diversos productos químicos.

El bio-reactor fermentador, será construido de acero inoxidable tipo 304, con eje vertical, equipado con una camisa y chaqueta de calefacción, un agitador de paletas accionado con un motor eléctrico, un serpentín desmontable de cobre, para mantener uniforme la temperatura en todo el equipo.

### **2.3.12. Cinética de las reacciones de fermentación**

El rol de la Ingeniería Química en la interrelación con otras ciencias para el desarrollo de la bio-tecnología radica fundamentalmente en el diseño y operación de bio-reactores, que permita el desarrollo de procesos biológicos a nivel industrial.

El ingeniero químico deberá seleccionar el tipo y tamaño del reactor adecuado, así como las variables de operaciones óptimas (tales como presión, temperatura, composición, etc.) para el volumen de producción estimado.

En el diseño de bio-reactores, se quiere conocer las velocidades de los procesos tanto físicos como químicos, para establecer las ecuaciones de conservación para el tipo de reactor seleccionado, la forma de las ecuaciones dependen del tipo de reactor y de las velocidades de reacción.

Las velocidades de transferencia de masa y energía son teóricas, por lo que se requiere de datos experimentales para evaluar estos términos; puesto que no es posible predecir con precisión las velocidades químicas de reacción, es necesario determinarlos experimentalmente. De la formación suministrada por los datos experimentales, se deberá extraer la velocidad de reacción para ello es necesario separar el efecto de los procesos físicos de los datos observados. Los reactores de mayor tamaño, debido a que reducen al mínimo la importancia de los procesos físicos, lo que conduce a resultados más precisos de expresión de velocidad,



además es posible tener mayor flexibilidad en su diseño y empleo ya que no necesariamente su diseño debe corresponder al reactor a escala piloto o comercial debido a que la ecuación de velocidad de reacción es independiente de la ecuación de diseño para cada tipo de reactor, es así como que inclusive las variables optimas de operación para su reactor de laboratorio pueden diferir para uno de mayor escala.

Como el diseño del reactor no está enfocado al desarrollo de un modelo matemático, para la velocidad de reacción de un proceso en particular y que permita el diseño del reactor, sino mostrar en forma general algunas de las aplicaciones que la información suministrada por los datos experimentales en reactores para laboratorio, dirigidos al diseño y optimización de reactores de mayor escala.

Las reacciones de fermentación, son de dos tipos:

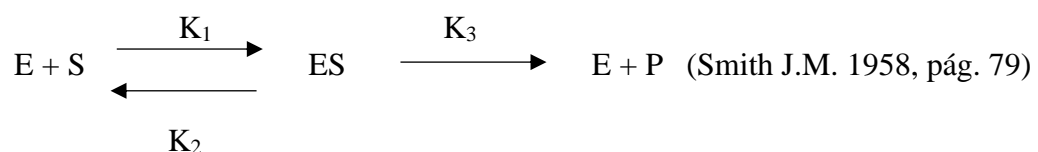
- Reacciones catalizadas por enzimas.
- Reacciones catalizadas por microorganismos.

### 2.3.12.2 Cinética enzimática

Las enzimas son proteínas de alto peso molecular, bajan la energía de activación de las reacciones catalizadas por enzimas al unirse al sustrato para formar un complejo enzima- sustrato, no afectando el cambio de energía libre o la constante de equilibrio de las reacciones. El sustrato se une a un sitio específico del enzima, conocido como centro activo, cada enzima es específica para un determinado sustrato.

Una enzima es un catalizador biológico y como todos los catalizadores, las enzimas aumentan la rapidez de la reacción química sin sufrir cambio químico permanente en sí mismas. Un catalizador influye en la rapidez de una reacción química, pero no afecta el equilibrio de esta.

El mecanismo general de las reacciones catalizadas por enzimas es:



El resultado S se combina con la enzima libre E, y forma un complejo, enzima – substrato ES, este producto intermedio es inestable. Y se descompone en el producto P y la enzima libre E, como puede observarse, las enzimas no se reproducen, encontrándose en forma libre o formando complejos, a diferencia de los procesos de fermentación microbiana en que los microorganismos si se reproducen.

Las enzimas son de tamaño coloidal comprendido entre 10 y 100 mm, por lo que las soluciones que contienen enzimas representan una región confusa entre sistemas homogéneos y sistemas heterogéneos. Un modelo cinético muy sencillo y conocido fue desarrollado por Michaelis – Menten (1913) y Briggs – Haldane (1925) para reacciones de un solo substrato y única enzima. Luego la velocidad de reacción es:

$$r_p = K_3 \frac{[S][E_0]}{K_m} \quad (\text{Smith J.M. 1958, pág. 41})$$

Donde:

[E<sub>0</sub> = E<sub>s</sub> la concentración de enzima total cargado al reactor.

K<sub>m</sub> = E<sub>s</sub> es una constante que mide la afinidad de la enzima por el substrato. Un valor bajo indica que la enzima tiene alta afinidad por el substrato

## 1. VELOCIDAD MÁXIMA

La velocidad máxima de reacción (V máx.) se obtiene cuando los centros activos de la enzima están saturados con substrato.

$$V_{\max} = K_3 [E_0]$$

Aplicando el concepto de V máx. a la expresión de velocidad de reacción:

$$r_p = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + S} \quad (\text{Smith J.M. 1958, pág. 41})$$

Como se puede observar Velocidad máxima se incrementa al añadir más enzima, pero la adición de más substrato no tiene influencia en velocidad máxima.

## 2. SIGNIFICADO DE LA CONSTANTE Km

Cuando  $[S] = K_m$ , la mitad de la enzima está en estado libre y la mitad esta combinada, por tanto:

Por tanto:

$$R_p = \frac{V_{\max}}{2} \quad (\text{Smith J.M. 1958, pág. 41})$$

Cuando  $[S] \gg K_m$ : La mayor parte de la enzima es por lo tanto.

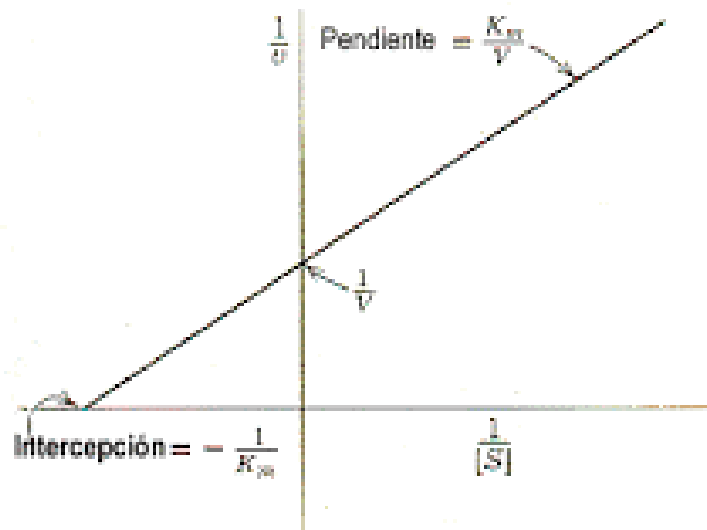
$$R_p = \frac{K_3 [S] [E_0]}{K_m} \quad (\text{Smith J.M. 1958, pág. 41})$$

## 3. REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS CINÉTICOS:

La determinación de  $V_{\max}$  y  $K_m$ , con alta precisión es difícil de determinar. Estos parámetros son obtenidos gráficamente de datos experimentales. Debido a este se ha recurrido a muchas linealizaciones de las ecuaciones de Michaelis – Menten de las cuales la más popular es la gráfica de LINEWEAVER – BURK, la cual está dada por la expresión de velocidad siguiente:

$$\frac{1}{r_p} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} [S]} \quad (\text{Smith J.M. 1958, pág. 41})$$

Una gráfica de  $1/r_p$  VS  $1/[S]$  produce una línea recta con una pendiente  $K_m/V_{\max}$ , una coordenada al origen  $1/V_{\max}$ . Y una coordenada sobre la abscisa de  $-1/K_m$ , Fig. 9



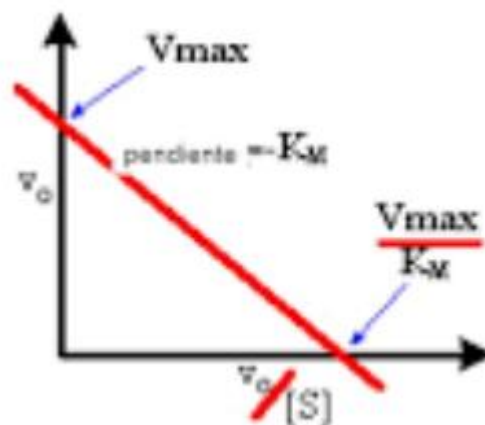
**Figura 9:** Gráfica de Lineweaver - Burk

Este método da buenas estimaciones de  $V_{m\acute{a}x}$ , pero no necesariamente de  $K_m$ . Para bajas concentraciones de substrato el ajuste de la curva en esta regi3n puede llevar a mucha disposici3n. Para datos muy dispersos este planteo proporciona una representaci3n m\acute{a}s f\acute{a}cilmente interpretable.

El arreglo de la Ec. De velocidad de EADIE – HOFSTEE es la siguiente:

$$R_p = V_{m\acute{a}x} - K_m \cdot \frac{R_p}{[S]}$$

Un planteo de  $R_p$  Vs  $R_p/[S]$  da como resultado una l\nea de pendiente  $-K_m$  y el punto de intersecci3n al eje y representa  $V_{m\acute{a}x}$ , tal como se muestra en la Fig. 10.



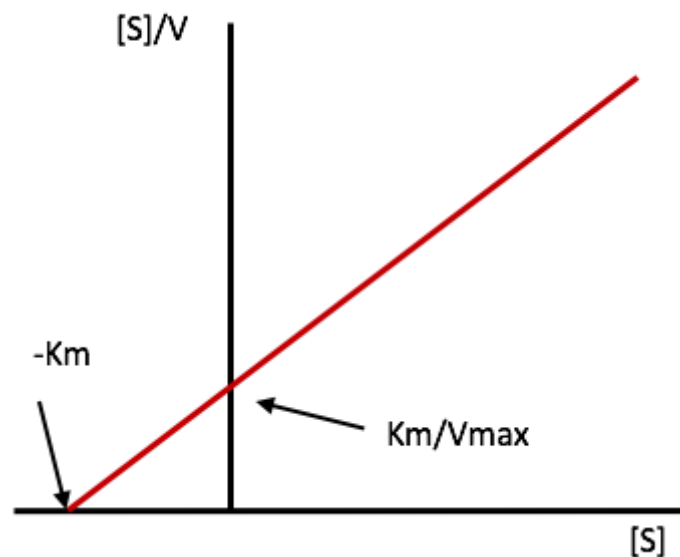
**Figura 10:** Gráfica de Eadie – Hofstee

Este planteo puede estar sujeto a muchos errores, puesto que ambos ejes contienen Rp. Pero da mejores resultados para regiones de bajas concentraciones de sustrato.

La ecuación de velocidad arreglada de Hanes – Wolf es la siguiente:

$$\frac{[S]}{R_p} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} [S] \quad (\text{Smith J.M. p\acute{a}g. 79})$$

Un planteo de  $[S]/R_p$  Vs  $[S]$  da como resultado una l\nea de pendiente  $1/V_{m\acute{a}x}$ . Y la intersecci3n con el eje y representa  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , tal como demuestra en la Fig. 11.



**Figura 11:** Gr\afica de linealizaci3n

Este planteo es utilizado para determinar  $V_{m\acute{a}x}$ . Como mayor precisi3n:

La variaci3n de  $[S]$  en el transcurso de la reacci3n enzim\atica batch, puede ser determinada integrando la ecuaci3n de velocidad:

$$V_{m\acute{a}x} \frac{[S_o] - [S]}{t} = \frac{K_m}{t} \ln \frac{[S_o]}{[S]} \quad (\text{Smith J.M. p\acute{a}g. 52})$$

Un planteo de  $1/\ln [S_o]/[S]$  Vs  $\{[S_o] - [S]\}$  da como resultado una l\nea pendiente  $-1/k_m$  y la intersecci3n al eje y representa  $V_{m\acute{a}x}$ .

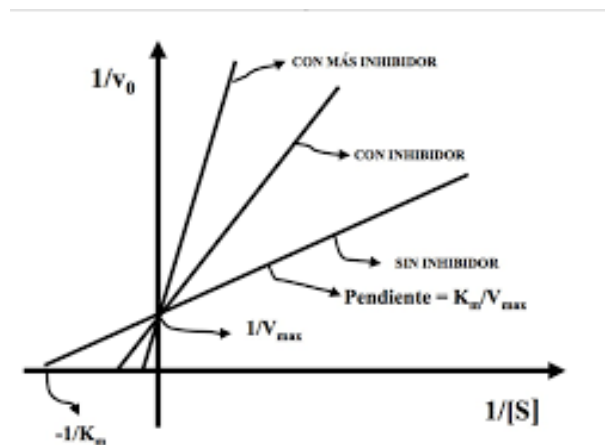
#### 4. INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

El inhibidor es una sustancia con una estructura química y especie análoga a la del sustrato, que une al sitio de la enzima inhibiendo así la unión del sustrato.

Los inhibidores son compuestos que al ser añadidos al medio pueden convertirse a enzimas y reducir su actividad. Los inhibidores pueden ser irreversibles o reversibles. Los inhibidores pueden ser irreversibles cuando forman un complejo estable con la enzima y al ser retiradas del medio, la enzima no recupera a su actividad inicial, los inhibidores reversibles pueden disociarse más fácilmente recuperando la enzima en su actividad inicial.

#### 5. INHIBICIÓN COMPETITIVA

El inhibidor es un sustrato análogo y composición al sustrato por el sitio de la enzima. Puede ser descrito como sigue:

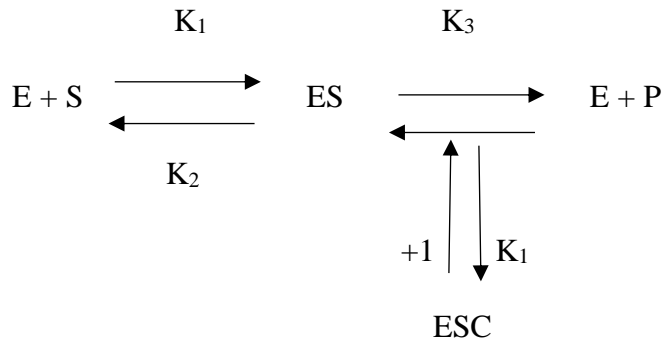


**Figura 12:** Gráfica inhibidor competitiva de Michaelis Menten.

#### 6. INHIBICIÓN INCOMPETITIVA

En este caso el inhibidor se une a ES pero no a la enzima libre; por lo tanto, aun cuando la concentración de sustrato sea saturante, la enzima se distribuirá que contiene el inhibidor ECS, en una relación que depende de  $K_I$ , por tanto, ECS es un complejo terminal capaz de dar el producto ECS y es un complejo terminal capaz de dar el producto directamente. En consecuencia  $V_{m\acute{a}x}$  aumentará con el factor  $(1=1/K_I)$ , mientras que  $K_m$  realmente disminuirá, esto se debe a que el inhibidor. I. “jala” la enzima hacia el estado unido con el sustrato y  $K_m$  es una medida de la habilidad del sustrato para “empujar” la enzima hacia el complejo es:





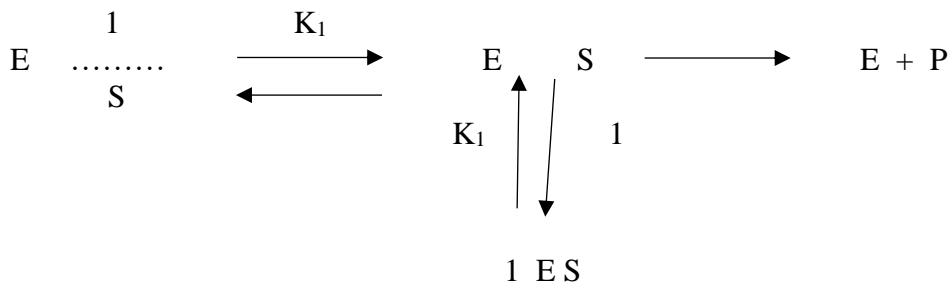
Ahora hay dos sitios de unión en la enzima, uno para el sustrato y otro para el inhibidor.

$$R_p = (ESC) (E)(i)/K_1$$

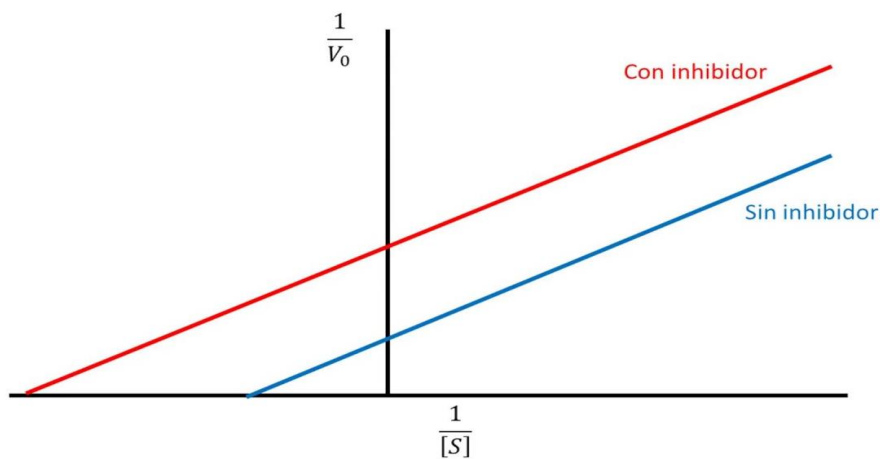
$$E_1 = (E) + (ES) + (ESC)$$

En consecuencia:

$$E_1 = (ES) (1 + 1/K_1) + (E)$$



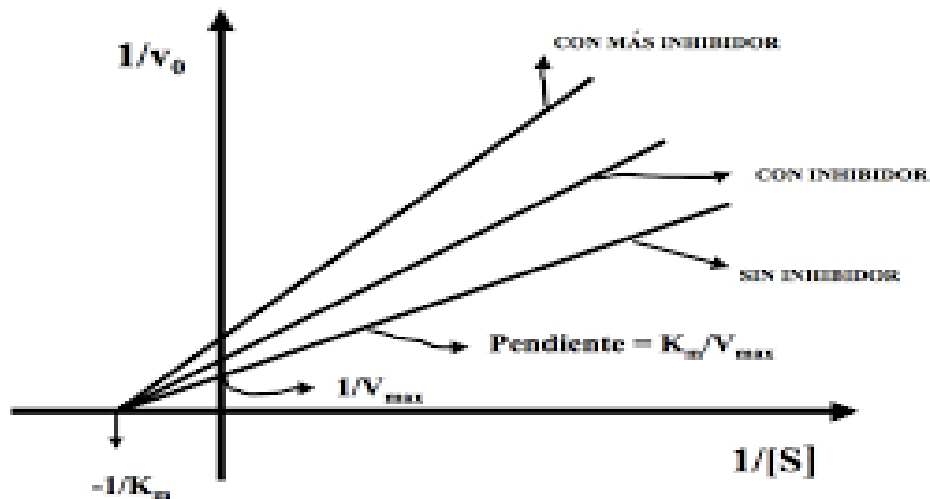
En la Fig. 13 se muestra la inhibición incompetitiva



**Figura 13:** Gráfica de la inhibición incompetitiva

## 7. INHIBICIÓN NO COMPETITIVA

Un inhibidor no competitivo se puede unir a la enzima libre E, y al complejo enzima substrato ES no competitivo EI e EYS, EIS no se puede descomponer para el producto y la enzima:

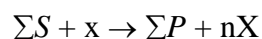
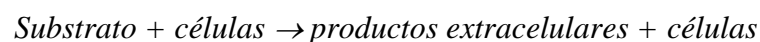


**Figura 14:** Gráfica de la inhibición no competitiva

El efecto neto de la inhibición no competitiva es una reducción de  $V_{m\acute{a}x}$ . Altas concentraciones de sustrato no podrían vencer la inhibición no competitiva. Se requieren añadir otros reactivos para bloquear la unión del inhibidor a la enzima. “El complejo ECS puede formar el producto”.

### 2.3.12.3 Cinética del crecimiento microbiano

Para los microorganismos el crecimiento es la respuesta más importante a su medio ambiente físico químico; es un medio adecuado de nutrientes, los organismos extraen los nutrientes del medio y los convierten en compuestos biológicos, parte de esos nutrientes son usados para la biosíntesis y la formación de productos.



La velocidad de crecimiento microbiana está caracterizada por la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = (1/X) (dx/dt) \quad (\text{Smith J.M. pág. 55})$$



Donde:

X = Concentración de la masa celular.

T = Tiempo (h)

M = Velocidad específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>)

Una curva de crecimiento batch, incluye las siguientes fases:

#### 1. FASE DE ACOSTUMBRAMIENTO

Ocurre inmediatamente después de la inoculación, es un periodo de adaptación de las células a su medio ambiente, los microorganismos reorganizan sus constituyentes moleculares de acuerdo a la composición de los nutrientes, sintetizando nuevas enzimas; industrialmente para obtener alta productividad esta fase debe ser la más pequeña posible.

#### 2. FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL

Debido a las altas concentraciones de los nutrientes, las células pueden reproducirse rápidamente. Todos los componentes celulares crecen con la misma velocidad, siendo la velocidad independiente de la concentración. En esta fase se logra la máxima velocidad de reproducción y la producción de metabolitos primarios.

#### 3. FASE DE RETARDO

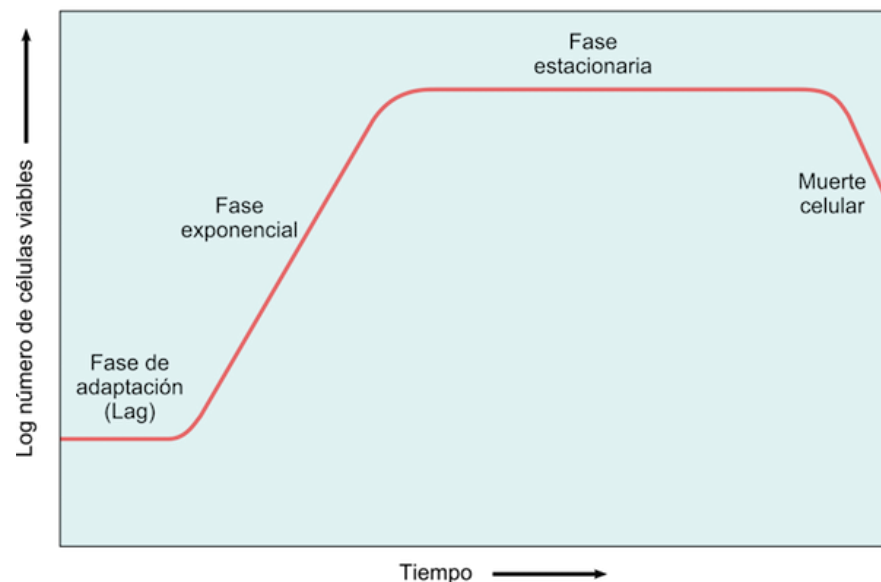
El crecimiento se retarda debido a la disminución de uno o más nutrientes o por la acumulación de productos tóxicos, causando una reestructuración de las células para aumentar sus perspectivas de sobrevivencia.

#### 4. FASE ESTACIONARIA

La realidad de crecimiento neto es cero, dado que la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte. En esta fase las células aún son metabólicamente activas y producen metabolitos secundarios debido a la redistribución celular.

## 5. FASE DE MUERTE

La muerte puede comenzar durante la fase estacionaria y una clara demarcación entre las dos fases no siempre al inicio de la fase de muerte, si las células son transferidas a un medio rico en nutrientes. En la Fig. 15 se muestra objetivamente las fases de la velocidad del crecimiento celular.



**Figura 15:** Fases del crecimiento microbiano

Existen diferentes modelos para describir la cinética de crecimiento, entre los más importantes se tiene:

- Modelos estructurados: Son modelos más realistas y complejos, consideran a la célula como una estructura, cuyos componentes y sus mecanismos metabólicos pueden cambiar en respuesta a perturbaciones en el medio ambiente extracelular.
- Modelos no estructurados: Estos modelos asumen una composición fija de la célula, esto es equivalente a asumir un crecimiento balanceado, el cual es válido principalmente para un cultivo continuo en estado estacionario y la fase exponencial de un cultivo batch. Si la respuesta celular es rápida comparada con los cambios externos y si la magnitud de dichos cambios no es demasiado grande.



El modelador debe siempre escoger el modelo más simple que pueda adecuadamente describir el sistema deseado. Algunos modelos no estructurados que describen el substrato como limitante del crecimiento son:

Mond:

$$M = \frac{M_m S}{K_s + S} \quad (\text{Smith J.M. pág. 55})$$

Blackman:

$$M = M_m \text{ si } S \geq 2K_s$$

$$M = \frac{M_m * S}{2K_s} \text{ si } S < 2K_s \quad (\text{Smith J.M. pág. 57})$$

Moser:

$$M = \frac{M_m * S^n}{K_s + S^n} \quad (\text{Smith J.M. pág. 58})$$

Contois:

$$M = \frac{M_m * S}{K_s X + S} \quad (\text{Smith J.M. pág. 59})$$



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PRINCIPIOS GENERALES DE DISEÑO

##### 3.1.1. Materiales.

Los principales materiales utilizados para la construcción del bio reactor, son fundamentalmente el acero inoxidable, el tubo de cobre como alternativa, que será también sustituido por el acero inoxidable, acero negro, el teflón como medio de empaquetadura, tubo galvanizado y tubo de cañería, para un volumen de 90 litros y la temperatura de trabajo es de 40°C a una presión de 1 atmósfera.

##### 3.1.1.1 *Acero inoxidable*

Es el material que normalmente se usa en la construcción de bio reactores de laboratorio, es el de vidrio boro silicato, mientras que para los bio reactores de gran tamaño se utiliza el acero inoxidable de calidad adecuada.

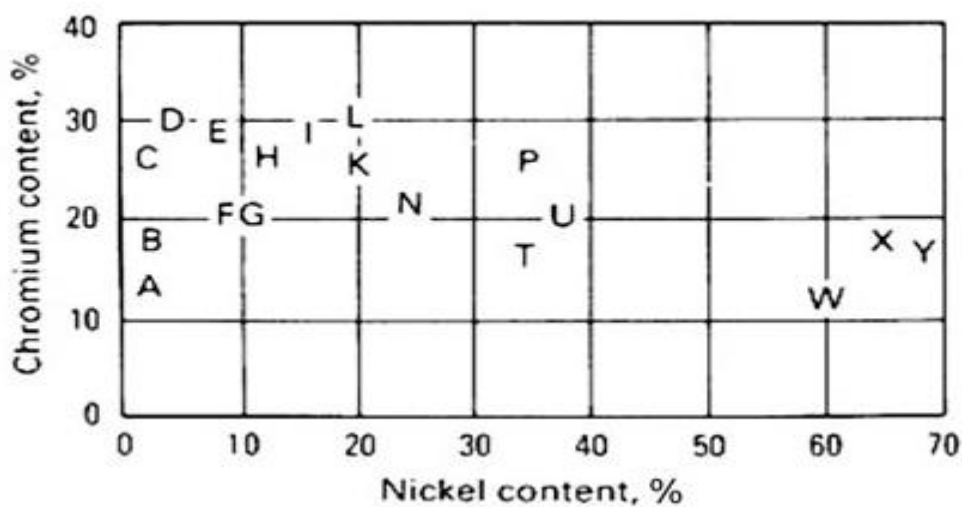
Dependiendo de su formulación, el acero posee diferentes propiedades mecánicas de resistencia, a la corrosión y a elevadas temperaturas, dificultad para tornearse y soldar, facilidad de fabricación y costo. <su resistencia a la corrosión y oxidación, se debe a la adición de cromo, el cromo otorga facilidad a las aleaciones ferrosas cuando está presente en más de 11%.

Los aceros inoxidables, se clasifican como tipo C (resistentes a la corrosión) usados en medios acuosos o temperaturas inferiores a 650°C, y los de tipo H (resistentes al calor) que pueden ser usados a temperaturas superiores a 650°C, 1 200°F, gracias a su alto contenido de carbono. (Gold.J, “Principios de diseño de equipos de proceso”, 1985, pág. 49)

Los aceros inoxidables frecuentemente son nombrados de acuerdo a su composición usando el sistema HIGH ALLOY PRODUCT GROUP OF THE STEEL FOUNDERS SOCIETY OF AMERICA (que reemplaza al ALLOY CASTING INSTITUTE o ACI). La primera letra del nombre indica la aleación, puede ser usada con líquidos corrosivos (C) o altas temperaturas

(H). La segunda letra denota el tipo nominal de la aleación cromo-níquel (Fig. 16) conforme aumenta la cantidad de níquel, la segunda letra cambia de la A a la Z.

El número que siguen a las dos primeras letras, indica el máximo contenido de carbono (porcentaje 100) de la aleación. Finalmente si más elementos están presentes en la aleación, estos se indican agregando una o más letras como un sufijo. Así, el nombre CF – BM, indica una aleación resistente a la corrosión, de tipo 19 Cr – 9 Ni, con un contenido máximo de 0,08 % de carbono y que además contiene molibdeno (M).



**Figura 16:** Contenido de cromo y níquel de acuerdo a los estándares ACI para los aceros inoxidables resistentes al calor y a la corrosión.

**Fuente:** ASTM METALS HANDBOOK

Dado que los bio reactores trabajan a bajas temperaturas, se prestará mayor atención a los aceros de tipo C.

La composición de los aceros fundidos tipo C, se detalla en la tabla 7, las aleaciones están agrupadas como:

- Aceros al cromo
- Aceros al cromo - níquel
- Aceros al níquel – cromo

La resistencia a la corrosión aumenta cuando el contenido de carbono es menor a 0,20 %.

**Tabla 7:** Composición química y microestructura característica de los aceros inoxidables ACI resistentes a la corrosión

TIPO ACI	TIPO DE ALEACIÓN	COMPOSICIÓN %				
		C	Mn	Si	Ct	Ni
Aceros al cromo						
CA – 15	410	0,15	1,0	1,5	11,5-14,0	1,0
CA - 15M	--	0,15	1,0	0,65	11,5-14,0	1,0
CA - 40	420	0,40	1,0	1,5	11,5-14,0	1,0
CA – 4DF	--	0,2-04	1,0	1,5	11,5-14,0	1,0
CA – 50	446	0,3	1,0	1,5	26,0-30,0	3,0
Aceros al cromo-níquel						
CE – 30	31e	0,3	1,5	2,0	26,0-30,0	8,0-11,0
CE – 30	304L	0,03	1,5	2,0	17,0-21,0	8,0-12,0
CE – 3M	316L	0,03	1,5	2,0	17,0-21,0	8,0-12,0
CF – 8	304	0,08	1,5	2,0	18,0-21,0	8,0-11,0
CF – 8C	347	0,08	1,5	2,0	18,0-21,0	9,0-12,0
CF – 8M	316	0,08	1,5	2,0	18,0-21,0	9,0-12,0
CF – 12M	316	0,08	1,5	2,0	18,0-21,0	9,0-12,0
CF – 16F	303	0,16	1,5	2,0	18,0-21,0	9,0-12,0
CF – 20	302	0,20	1,5	2,0	18,0-21,0	8,0-11,0
CK – 20	310	0,2	2,0	2,0	23,0-27,0	19-22,0
Aceros al níquel- cromo						
CN – 3M	--	0,03	2,0	1,0	20,0-22,0	23,0-27,0
CN – 7M	--	0,07	1,5	1,5	19,0-22,0	27,5-30,5
CN – 7MS	--	0,07	1,5	3,5	18,0-20,0	22,0-25,0

**Fuente:** ASTM METALS HANDBOOK





La adición de níquel a las aleaciones hierro-cromo, aumenta la ductibilidad y la resistencia a los impactos, además aumenta la resistencia al ataque por picaduras de cloruros y del anhídrido sulfuroso y además aumenta el grado de pasividad, en soluciones con características oxidativas bajas.

La adición de cobre a las aleaciones dobles de Ni-Cr da lugar a aleaciones de alta dureza, mientras que en las aleaciones estéricas de una sola fase aumenta gradualmente su resistencia a la corrosión por ácido sulfúrico.

En todas las aleaciones Fe – Cr –Ni puede aumentarse su resistencia a la corrosión por ataque inter granular, bajando el contenido de carbono.

Los aceros tipo C son usados ampliamente en procesos químicos y en equipos generadores de energía que requieren resistencia a la corrosión en medios acuosos o líquido – vapor.

Los aceros inoxidable al cromo, contienen del 10-30% de Cr y muy poco o nada de Ni, su resistencia a la corrosión aumenta conforme aumenta el contenido de Cr.

Las aleaciones de Fe – Cr –Ni generalmente son austéricas con algo de ferrito, usadas en medios corrosivos severos, las más comunes son: CF – 8 y CF – 8M que corresponden a los tipos 304 y 316 respectivamente.

Las aleaciones CF – 3M y CF – 8M son modificaciones de CF – 3 y CF – 8, ya que contienen 2 – 3%, lo cual aumenta sus resistencia la corrosión por hendiduras y picaduras. Estas aleaciones son resistentes a medios tan corrosivos como los sulfuros y ácido acético y cloruros fuertes, son adecuadas para usarlas en medios acuosos en movimiento, tales como el agua de mar, ya que se pican en medios estancados.

Aleaciones Fe – Ni –Cr, pueden resistir a todas las concentraciones de ácido sulfúrico a temperaturas mayores de 65°C y muchas concentraciones por encima de 80°C son bastante usadas con soluciones nítricas, hidrofúorhídricas, ácido fosfórico, ácido clorhídrico diluido frío, ácido acético caliente, soluciones acústicas concentradas y calientes, salmueras y muchas soluciones complejas de galvano plastia.

La influencia que ejerce los contaminantes es una de las consideraciones más importantes que debe de tenerse en cuenta al momento de seleccionar una aleación para un proceso determinado. El cloruro férrico en cantidades muy pequeñas, provocará por ejemplo aumento de la celda de corrosión en una solución de cloruros puede elevar la

concentración de Fe hacia un nivel suficientemente alto para ser destructivo. De este modo las sales de cloro, gas de cloro húmedo y de compuestos orgánicos clorados no pueden ser manipulados en aleaciones a base de Fe, sino en aleaciones a base de Ni.

En resumen, comercialmente los aceros disponibles en el mercado local son los de calidades 304, 304L, 316 y 316L.

Las propiedades mecánicas de los aceros inoxidable más comerciales se muestran en la tabla 8.

Comparando su composición química y sus propiedades mecánicas se puede determinar que los aceros 316 y 316L, presentan mayor contenido de Ni y Mo, lo que los hace más resistentes al ataque por ácidos, que los 304 y 304L. (Gold.J, “Principios de diseño de equipos de proceso”, 1985, pág. 809)

Los aceros calidad 304 y 304L, contienen mayor porcentaje de cromo que los hace más resistentes a la corrosión por picadura, su contenido de Cr y Ni les proporciona cierta ductibilidad.

Por lo tanto, para la construcción del fermentador se selecciona el acero inoxidable 304L, por su costo, ductibilidad y facilidad para soldar, dado que los medios de cultivo, productos y soluciones desinfectantes no son considerados como elementos fuertemente corrosivos.

**Tabla 8:** Propiedades mecánicas del acero inoxidable

<b>Tipos de acero</b>	<b>Resistencia a la tracción</b>	<b>Límite de elasticidad</b>	<b>Alargamiento</b>	<b>Dureza</b>	<b>Peso específico</b>
304	65	31	60	82	8,06
304L	59	30	58	80	8,06
316	60	31	57	81	8,06
316L	59	31	57	80	8,06
430	50	--	57	82	7,78

**Fuente:** Aceros inoxidables DISCOVERY S.A. Lima – Perú



### 3.1.1.2 Teflón

NOMBRE TÉCNICO	: Politetra fluor etleno PTFE
NOMBRE COMERCIAL	: Algoflon, Anon, Italon, Teflon.
PROPIEDADES:	
Resistencia a la abrasión	: 500 – 1000 mg/1000
Temperatura de deflexión	: 121°C a 66P si (ASTM)
Punto de fusión	: 327°C
Esfuerzo a la tensión a 25 °C	: 2500 – 6000 Psi.
Rango de temperatura de trabajo	: -200° a 260 °C.

El PTFE resiste prácticamente a todas la sustancias químicas a solventes, inclusive a su temperatura límite, que es la temperatura más alta de los plásticos disponibles en el mercado.

Las excelentes propiedades físicas y sus resistencia química se debe a que el enlace que predomina en este compuesto es el C-F, el más fuerte de los enlaces de los compuestos orgánicos, además de las fuerzas de Van der Walls.

El flúor otorga a los plásticos mayores ventajas debido a su carbono. Si el plástico es totalmente fluorado como el PTFE tendrá una resistencia a la corrosión mayor que el PP, PE, PVC.

En general los plásticos presentan valores a la abrasión, coeficiente de fricción, solubilidad y cualidades de lubricación muy similares a la de los metales, sin embargo el PTFE no debe usarse para partes móviles que se encuentran en constante fricción.

El teflón es usado en juntas de tuberías, sustancias químicas, gasolina, especialmente para ácidos fuertes, vapor, solventes, aceites, frío y caliente, oxígenos líquido, los espesores de plancha son 1/32 pulg. 1/16 pulg. 3/16 pulg. Y de ¼ pulg. (Discovery S.A. “Aceros Inoxidables” pág. 104)

De acuerdo a la conclusión y los valores que se vieron, el material más adecuado es el material inoxidable de tipo 304.



### 3.1.2. Mezclado

El mezclado es importante para asegurar que se mantenga el ambiente adecuado para el crecimiento, esto se consigue al crear turbulencia mediante la agitación mecánica o el burbujeo de gas, la fuerza de convección transmitida aumenta la transferencia de calor lo que favorece el control de la temperatura y la transferencia de masa, afectando la disolución de los gases al dispensar rápidamente los fluidos de control que se inyectan.

#### 3.1.2.1 Reología

La reología de un fluido describe la forma en que el fluido reacciona frente a las fuerzas que se aplican a través de los agitadores o burbujas de gases y el movimiento resultante. En los caldos de fermentación las propiedades biológicas se pueden ver afectadas, en gran manera por la presencia de ciertos tipos de componentes en el medio, así como por el tipo de cultivo microbiológico que en él se desarrolle. Uno de los problemas en el diseño de fermentadores es que no solo es difícil predecir, sino que puede cambiar el curso de una fermentación de tipo interrumpido. Los componentes de un caldo de cultivo pueden conferir al medio líquido propiedades de material casi sólido además de las inherentes al propio líquido.

Los fluidos que se manejan en los fermentadores muestran algunas características de comportamiento diferente, que se puede considerar cada una, como un caso particular. Las sustancias poliméricas, tales como los nutrientes polisacáridos o los productos sintéticos de ciertos organismos, se introducen en una solución newtoniana, su viscosidad aumenta convirtiéndose en un fluido no newtoniano. Pero cuando se intenta calcular los requerimientos energéticos para la agitación de fluidos newtonianos se presenta dos problemas. En primer lugar la velocidad de corte, y por tanto, la viscosidad no es uniforme a lo largo del fermentador, ya que alcanza su nivel más alto cerca del agitador y, en segundo lugar, debido a que algunos caldos de fermentación son tan viscosos que es prácticamente imposible alcanzar la turbulencia total.

Sin embargo en los organismos mono celulares, tales como bacterias y levaduras, cuando se cultivan en un medio newtoniano mantienen sus características a pesar de que aumente la viscosidad. Por otra parte cuando un



organismo filamentosos se cultivan, de manera, que se formen agregados o gremios no consistentes, su reología se hace no newtoniana. Los caldos de cultivo que contengan filamentos cortos tienen una viscosidad aparente menor que aquellos que contengan la misma cantidad de biomasa, pero que poseen filamentos largos, estos se enrollan para formar grandes masas, disminuyen la velocidad y se comportan de una manera casi newtoniana, tienen un comportamiento newtoniano al comienzo y al final del cultivo, pasando a la fase intermedia a través de un estado plástico.

En otro tipo de cultivos se forma durante el transcurso del crecimiento de los microorganismos, un micelio espeso que puede presentar las características de un fluido pseudo plástico y a veces tixotrópico, la forma de operar las propiedades físicas de los microorganismos que intervienen en las reacciones de fermentación. En condiciones normales los microorganismos contienen una cantidad de agua considerable (60% a 95%) y en consecuencia tienen una densidad solo ligeramente diferente a la del agua. Se requiere pues un empuje hidrodinámico muy pequeño para mantenerlos en suspensión.

#### *3.1.2.2 Suministro de oxígeno*

El crecimiento de un organismo aerobio en el cultivo sumergido requiere oxígeno disuelto en el medio. El oxígeno debe ser suministrado continuamente ya que es solo escasamente soluble en una solución acuosa. La transferencia de oxígeno del gas hacia los microorganismos se lleva a cabo en el interior del fermentador.

Primeramente el oxígeno debe bajar a través del gas hacia la interfase gas – líquido, después a través de la interfase, luego a través del líquido y finalmente, hacia el organismo. El proceso completo es impulsado por la diferencia entre las concentraciones de oxígeno en el gas y en el microorganismo.

El papel de los dispositivos de aeración es suministrar el oxígeno necesario para el crecimiento y también favorece la agitación del medio.

Normalmente el aire ingresa a una presión ligeramente superior a la presión atmosférica, ya que ensayos realizados con oxígeno puro han indicado que este puede tener un cierto nivel de toxicidad para los microorganismos.



La reserva de gas contenida en el protoplasma es siempre muy bajo debido a que las enzimas que están localizadas en el interior del protoplasma de los microorganismos no pueden utilizar el oxígeno mientras este no se encuentre disuelto en el mismo y además por la baja solubilidad del O<sub>2</sub> (en agua pura es 7 p.p.m. , a 37 °C).

Experimentalmente se ha demostrado que por debajo de un valor crítico de oxígeno disuelto existen perturbaciones metálicas que desencadenan la muerte de las células. Este valor crítico que juega el papel de un factor limitante, es realmente bajo y varía de unos microorganismos a otros, aunque en general se puede decir que oscila entre 0,003 y 0,009 mil – moles por litro.

También es importante conocer la cantidad máxima de oxígeno necesario para el micro organismo ya que se relaciona con los siguientes parámetros:

- Edad del cultivo.
- Estado de crecimiento.
- Concentración celular.
- Producción de ciertos metabolismos.
- Variación de la composición del sustrato.

La demanda máxima de oxígeno de los microorganismos puede variar a lo largo del proceso de fermentación, de ahí que sea imprescindible el poder estimar la velocidad de absorción que es un fenómeno complejo.

El oxígeno contenido en una burbuja de aire debe recorrer un largo camino antes de ponerse en contacto con una enzima situada en un organismo en suspensión en el medio de un cultivo, encontrando un cierto número de resistencias debidas a la presencia de interfaces de aspersores variables y que dependen del grado de turbulencia del medio líquido.

#### ***Tipos de aparatos para dispersar el aire:***

##### *a) Discos porosos*

Se utilizan sobre todo, cuando se dispone de medios mecánicos de agitación para subdividir las burbujas gruesas de aire y se desea que el tamaño de estas sea pequeñas.



Para su fabricación, se han utilizado diversos tipos de metales porosos, vidrio, cerámica, bronce, aceros inoxidable, etc.

Las desventajas de estos dispositivos son:

- Eficacia en la aireación, está limitada debido a la ausencia de una buena agitación.
- La presión aplicada debe ser más elevada a causa de la resistencia a la circulación de gas a través de un metal poroso utilizado en la fabricación del disco.
- Provocan con frecuencia el fenómeno de coalescencia o reunión de burbujas del tamaño mayor.
- La superficie exterior del dispositivo puede ser obturada por materiales orgánicos y microorganismos, lo que provoca un mal funcionamiento del mismo.

#### *b) Dispersadores perforados*

En la práctica industrial, los dispositivos previstos de orificios sencillos están siendo utilizados más extensamente debido a sus buenos resultados y fácil instalación. El número, las dimensiones y la disposición de los agujeros en el aireador, varían según el tipo de la instalación porque solo la experiencia determina adecuadamente estos datos, de cualquier forma se puede decir que en general el diámetro de los agujeros de aireación en los fermentadores industriales oscila entre 0,7 y 3,2 mm.

En los fermentadores pequeños, estos dispersadores tienen pocos agujeros u orificios colocados debajo de la turbina de agitación.

De acuerdo a los objetivos el oxígeno se suministra por medio de una compresora y que esta se inyecta por la parte interna e inferior del fermentador.

### **3.1.3. Sistema de agitación**

Para seleccionar el equipo, es necesario conocer el ambiente en el que se va a operar, las configuraciones de montaje del agitador y un profundo análisis mecánico de los componentes del impulsor, los principales componentes de un agitador son el motor, unido al control del agitador, el sello del agitador, el eje del agitador y el impulsor. El



motor proporciona la potencia necesaria para mover el impulsor. La unidad de control del agitador transmite potencia, reduce la velocidad del motor e incrementa el torque. Además proporciona soporte para el eje del agitador.

La unidad de transmisión está compuesta por el motor, la transmisión del agitador y las uniones que los conectan.

El medio en el cual opera el agitador, es una combinación de fuerzas y momentos producidos por la agitación del contenido del recipiente y por las condiciones ambientales dentro y fuera del recipiente. Las fuerzas y momentos son el resultado del movimiento del fluido producido por la rotación del impulsor. Las condiciones ambientales, independientemente de la agitación, incluye factores tales como presión, temperatura y corrosión.

#### **3.1.4. Transmisión de calor**

En un bio-reactor debe existir transferencia de calor para que se mantenga una temperatura fija durante la fermentación, así como realizar una rápida y completa esterilización térmica. Ambas funciones se llevan a cabo de distinta manera.

Para la esterilización térmica exige un calentamiento muy rápido, mantener el sistema un cierto tiempo a esa temperatura, después enfriarlo. El control de la temperatura es lo más crítico, ya que si no se mantiene la temperatura durante la fermentación se pueden producir bajos rendimientos pérdidas de productos, o productos inadecuados, para diseñar correctamente un sistema de calentamiento hay que suministrar o evaluar durante la fermentación, las condiciones meteorológicas, las temperaturas de fermentación y los costos de las inversiones principales y auxiliares además de los gastos de funcionamiento probables, según el tipo de aparato.

En dichos sistemas, el fluido calefactor y/o refrigerante circula a través de la camisa o chaqueta que rodea al reactor y por el serpentín que está colocado en forma de espiras dentro del equipo, en los cuales el flujo es regulado mediante válvulas o bombas, a velocidades de flujo elevadas aumenta la turbulencia y también el coeficiente global de transferencia de calor.

Las camisas de calentamiento y/o enfriamiento tienen un coeficiente de transferencia de calor menor que los serpentines; la superficie específica dependiente del tamaño y para recipientes similares es inversamente proporcional al diámetro; a pesar de





sus limitaciones se prefiere en algunos casos debido a que no ocupan espacio al interior del recipiente, permiten calentar utilizando vapor de agua o refrigerar con agua o una disolución alcohólica enfriada para que aumente la variación de la temperatura.

Los serpentines interiores tienen una superficie de transmisión de calor que es prácticamente independiente del tamaño ya que los recipientes mayores disponen del espacio necesario para los serpentines siendo también mayor el coeficiente de transferencia de calor.

Los serpentines al interior del recipiente ocupan espacio, aumentan la superficie sobre la cual pueden adherirse los microorganismos, son difíciles de limpiar y pueden interferir en la dispersión de gas.

En general se puede decir que el efecto que ejerce el tamaño del recipiente sobre el área específica de transferencia de calor significa que las camisas son más adecuadas para los recipientes más pequeños y los serpentines para recipientes mayores. El límite entre estos tamaños los establece la geometría del recipiente y la reología del medio de cultivo.

El sistema de calentamiento se realiza a través del vapor, para su mayor eficiencia de transferencia de calor y garantice su calentamiento durante el proceso de fermentación.

### **3.1.5. Esterilización**

La esterilización es la eliminación de todos los microorganismos por remoción o muerte así con la inactivación de virus en o sobre un producto, las condiciones estériles favorecen:

- a) La formación de organismos indeseables.
- b) Que los nutrientes disponibles sean usados por los contaminantes y convertidos a células y productos indeseables.
- c) Que las condiciones del medio cambien a menudo.
- d) Que las enzimas producidas, por contaminantes pueden degradar cualquier producto formado.

Para entender la esterilización y sus técnicas es necesario entender la cinética de extinción de los microorganismos, es decir la pérdida de su capacidad para producir o crecer o dividirse.



Los principales métodos de esterilización son:

1. Calor húmedo, vapor
2. Calor seco
3. Pasteurización
4. Químicos
5. Radiación
6. Filtración

a) Esterilización térmica

Consiste en calentar a una temperatura suficientemente elevada. Alrededor de 90°C que es la temperatura del vapor saturado a 1 atm, y mantener esa temperatura el tiempo adecuado. Antes de la esterilización es esencial una limpieza total, ya que los residuos se adhieren a la superficie por el calor y sirven como sustratos de los microorganismos que han sobrevivido al tratamiento térmico.

Existen dos procedimientos alternativos para la esterilización, cargar el bio-reactor con todo a parte del medio de cultivo y se esteriliza todo junto, o bien se esteriliza el medio y el bio-reactor por separado, ya que algunos componentes pierden su valor nutritivo a elevadas temperaturas. En los procesos continuos es necesario esterilizar por separado, mientras que en los procesos por cargas la elección depende de la flexibilidad que se requiere en la operación.

Durante el calentamiento las superficies interiores y exteriores de las fábricas y de los equipos son puestas en contacto directo con vapor húmedo a través de un serpentín o camisa posteriormente es enfriado y suplementado con aire estéril.

El medio puede ser esterilizado, burbujeando directamente vapor de agua en un intercambiador de calor de placas o espiral a través de un sistema de inyección de vapor tipo Venturi.

b) Esterilización sin calor

Se emplea cuando se esterilizan materiales que pueden ser destruidos durante la esterilización.



Los líquidos que no llevan partículas en suspensión pueden esterilizarse pasándolos a través de filtros especiales como la cerámica vidriada y las membranas plásticas con distintos tamaños de poros.

La esterilización por filtración elimina todas las partículas mayores de tipo orgánico así como los organismos tanto vivos como muertos.

Los líquidos contienen sólidos en suspensión pueden ser esterilizados mediante radiación o tratamiento con un agente químico. La esterilización química pueden también emplearse en recipientes y componentes no metálicos, sistemas de medida y sensores delicados, especialmente diseñados para evitar las fisuras o superficies rugosas donde se pueden alojar los microorganismos y donde no tenga acceso al fluido esterilizante.

Los esterilizantes químicos más utilizados industrialmente son:

#### - **Compuestos clorados**

El más utilizado de este grupo es de solución acuosa de hipoclorito de sodio conteniendo 9 – 12% de cloro disponible; el cloro ejerce una rápida acción bactericida contra las bacterias dejando un residuo no tóxico (cloruro sodio), su eficiencia disminuye en presencia de materia orgánica, por ello antes de la esterilización las superficies se han de limpiar y escurrir completamente hasta que no queden remanentes de detergentes orgánicos. La concentración que se recomienda utilizar en los aparatos de acero inoxidable es de 150 a 250 mg/L de cloro disponible en un tiempo de contacto de 15 minutos, aparatos de aluminio no se debe superar la concentración de 200 mg/L.

#### - **Compuestos de Amonio cuaternario**

Son compuestos detergentes catiónicos estables al calor, incoloro, inodoros y no tóxicos si las concentraciones de las disoluciones son adecuadas.

Las sales de amonio son muy efectivas contra las bacterias gran positivas y un tanto menos contra las bacterias gran positivas y un tanto menos contra las negativas, su eficiencia bactericida se reduce en presencia de materia orgánica, debido a su carácter catiónico no debe mezclarse con detergentes aniónicos, tienen una notable tendencia a formar espuma.



### - Iodo foros

Son compuestos solubles formados por ajustes de superficie activa no iónicos y yodo; poseen propiedades detergentes y bactericidas. Su acción bactericida es rápida en solución acida fría. Son estables, no tóxicos y no imparten olor o gustos indeseables.

### - Bactericidas anfóteros – anfóliticos

Son sustancias orgánicas (generalmente aminoácidos sustituidos) que contienen grupos ácidos y grupos básicos. Según el pH exhibe propiedades aniónicas o catiónicas, poseen propiedades de superficie activa, poder humectante, penetrante y acción bactericida.

De acuerdo a las posibilidades y ventajas para la manipulación del bio-reactor se usa para la esterilización por un medio de calor.

### 3.1.6. Geometría del reactor

#### 3.1.6.1 Criterios para el dimensionamiento

El volumen de trabajo característico de un bio-reactor esta alrededor del 75% del volumen total del reactor, el espacio en la cabecera es para la espuma o el gas que se libera durante el proceso.

Existe un número infinito de selecciones de longitud – diámetro para satisfacer el volumen total de la mayoría de bio – reactores es construido con una relación.

INCUSTRAR Equation.  $u7D = 1.6$  a  $3$ ; en este caso se toma como base de diseño, la relación  $1.75:1$ , puesto que es lo más económicos para tanques de baja presión para ser usado en laboratorio y además porque los tanques muy profundos provocan altas presiones hidrostáticas en el fondo del recipiente y al mismo tiempo da lugar a diferentes valores para la solubilidad del oxígeno en el fondo del reactor en cada una de las fases.

El modelo adecuado es cilíndrico, la que ofrece mayor facilidad para que operen en este proceso de fermentación.

#### 3.1.6.2 tipos de cabezales

Los cabezales del cilindro reactor puede ser semiesférico elípticos, policéntricos, cónicos y planos.



#### - ELIPTICOS

Este tipo de cabezales junto con otros policéntricos son los más utilizados para bajas y medianas presiones y a veces para altas presiones, debido a la facilidad de su estampación.

#### - POLICÉNTRICOS

Formados por una figura de velocidad cuyo perfil (sección del fondo con plano que pase por eje cilíndrico) interno es obtenido mediante dos radios de curvatura con centros diversos. Este tipo de cabezales es utilizado en el torio esférico.

#### - HEMISFÉRICO

Su construcción es más costosa que el resto de cabezales bombeados por lo que su utilización se restringe a casos específicos de grandes espesores o materiales especiales.

#### - CABEZALES CONICOS

Dependen de la unión con la coraza se presenta dos formas de cabezales:

- Unión directa entre cono y casaca, este tipo de cabezal ofrece una mayor resistencia a la presión, por lo que su caso está limitado a cabezales con valores de semi – ángulos inferiores a 30°C.
- Con radio de acuerdo a transmisión de cono a cilindro por medio de zona esférica tangente a ambos elementos. El valor del semi – ángulo puede ser cualquiera, pero no es recomendable utilizar mayor de 45°C.

#### - CABEZALES PLANOS

Su utilización es muy escasa por presentar una sección muy poco resistente a la presión, lo que requiere grandes espesores su uso se restringe a recipientes de muy baja presión y diámetro pequeño.

Se puede concluir que el cabezal plano es más adecuado para parte superior del tanque, mientras que el torio esférico o ASME lo es como cabezal inferior, ya que el bio-reactor trabajara a baja presión y además porque es más fácil construir y de realizar su limpieza.



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN (CÁLCULOS DE INGENIERIA)

#### 4.1 DISEÑO DEL EQUIPO

- Tipo de reactor: Reactor batch de tanque agitador.
- Volumen total: 96, 343 litros.
- Volumen operativo: 40 a 60 litros.
- Cilindro interno: Acero inoxidable de calidad 304.
- Cilindro externo: Acero negro de 1/8 de pulgada.
- Paletas: Acero inoxidable de 10cm.
- Medidor de temperatura: 0° a 200° C.
- Medidor de vapor de agua: 0 a 50 psi.

#### *MEDIOS DE CULTIVO:*

La mayoría de los medios de cultivo están compuestos principalmente por agua, es por ello que a muchos de ellos se le atribuyen las propiedades del agua, sin embargo el fluido seleccionado es la melaza de 27°Brlx y pH = 5.2, para que pueda fermentar la totalidad de la sacarosa.

La fermentación del mosto dura 72h, aproximadamente, durante las cuales la temperatura sube, como la temperatura se debe mantener a 37°C, para evitar la destrucción de las enzimas se refrigera por medio de agua que circula por la chaqueta y el serpentín.

- Operación del reactor: 1 batch.
- Presión de operación: 1 atm.
- Temperatura máxima de operación: 120°C
- Temperatura optima de fermentación: 37°C

Para mantener la temperatura del medio de cultivo se requiere de un sistema de calentamiento, en bio – reactores se recomiendan las chaquetas de transferencia de calor y los serpentines, la chaqueta no ocupa espacio en el interior, no proporciona área adicional para la adherencia pero se consideran mínima se tiene que garantizar una dosificación suave de calor, para evitar que los microorganismos, sufran un choque térmico.

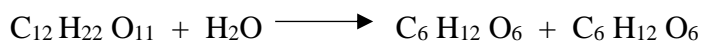
Muchos procesos fermentativos requieren eliminar el calor generado o bien se desarrollan a bajas temperaturas. El enfriamiento deberá realizarse por circulación del fluido refrigerante a través de la chaqueta y serpentín.

- Los impulsores utilizados para el uso biológico son los discos de turbina, mientras que los impulsores máximos y de paletas son importantes para sistemas celulares con alto nivel de sensibilidad al corte (Hicks T.G. 1986 "Química" 1ª edición Mc. Edit. Limusa México Pág. 125).
- El diámetro del impulsor debe ser 30 – 40% del diámetro del reactor.
- La distancia opera en el fondo del tanque y el impulsor es igual al diámetro del impulsor.

#### 4.1.1. Balance de materia en el fermentador

Azúcar que se convierte en alcohol etílico.

Reacciones químicas:



Sacarosa                                  glucosa          fructuosa



Glucosa    alcohol etílico



Fructuosa    alcohol etílico

#### CALCULO DE LA CANTIDAD DE ALCOHOL OBTENIDO

- Cantidad de sacarosa que ingresa al bio-digestor de la melaza comercial de 87° Brix, dilución de la melaza con agua a hasta 27°Brix.
- Cantidad de agua de dilución por 20 litros de melaza

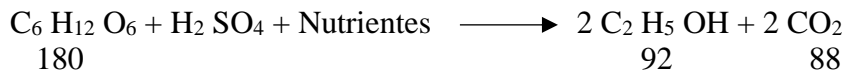
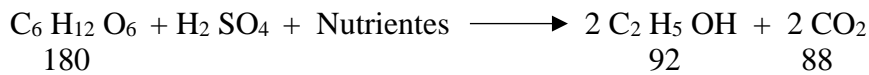
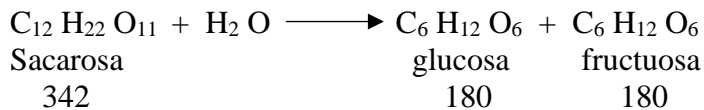
$$\text{Agua (litros)} = (\text{°brix melaza} - \text{°brix mosto}) / (\text{°brix mosto}) =$$

$$= (87-27) / 27(20) = 44.44$$

$$= 44.44 \text{ litros de agua}$$



### Reacciones principales de la sacarosa



La cantidad de 20 litros de melaza contiene la cantidad en Kg es lo siguiente:

$$= 20 \text{ litros} * 1.43 \text{ Kg/ litro} = 28.6 \text{ Kg. melaza}$$

La melaza contiene un 50% de sacarosa y se tiene lo siguiente:

$$= 28.60 \text{ Kg} * 0.50 \text{ Kg} = 14.3 \text{ Kg. sacarosa}$$

Cantidad de alcohol etílico obtenido en la fermentación

La sacarosa se desdobra en glucosa y fructuosa.

$$\text{Glucosa} = 14.3 \text{ Kg. sacarosa} * 180 \text{ Kg. Glucosa} / 342 \text{ Kg. sacarosa} = 7.526 \text{ Kg. Glucosa}$$

$$\text{Fructuosa} = 14.3 \text{ Kg. sacarosa} * 180 \text{ Kg. Fructuosa} / 342 \text{ Kg. sacarosa} = 7.526 \text{ Kg. Fructuosa}$$

En el proceso de fermentación se obtiene el alcohol etílico, como se tiene 7.526 Kg de glucosa y también de fructuosa dentro de melaza.

$$\text{Etanol} = 7.526 \text{ Kg. glucosa} * 92 \text{ Kg. Alcohol} / 180 \text{ Kg. Glucosa} = 3.847 \text{ Kg. Etanol}$$

$$\text{Etanol} = 7.526 \text{ Kg. fructuosa} * 92 \text{ Kg. Alcohol} / 180 \text{ Kg. fructuosa} = 3.847 \text{ Kg. Etanol}$$

En la fermentación se obtiene por glucosa 3.847 Kg. de etanol y la fructuosa produce 3.847 Kg de etanol en total se tiene.

$$\text{Alcohol etílico total formado} = 3.847 + 3.847 = 7.694 \text{ Kg. Alcohol etílico}$$

La densidad del etanol es 0.81 Kg / L. Se tiene = 7.694 Kg / 0.8125 Kg / L = 9.498 litros de etanol.





a) Preparación del mosto en Kg.

**Tabla 9:** Preparación del mosto en KG

<b>Materiales</b>	<b>Entrada (Kg)</b>	<b>Salida (Kg)</b>
Sacarosa	14,30	14,15
Agua	44,44	43,71
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,30	0,30
Pérdidas		0,88
<b>Total</b>	<b>59,04</b>	<b>59,04</b>

b) Fermentador

En el fermentador ingresa 58,15 Kg. de mosto, se esteriliza y se agrega la levadura y sus sales manteniéndolo a una temperatura de 37 °C, hasta la obtención del alcohol durante 48 h. en constante agitación.

**Tabla 10:** Proceso de la fermentación

<b>Materiales</b>	<b>Entrada (Kg)</b>	<b>Salida (Kg)</b>
Sacarosa	14,15	
Agua	43,71	38,87
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,30	
Úrea	0,10	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,15	
Levadura	0,25	
Alcohol		8,20
CO <sub>2</sub>		8,99
Otros		2,20
Pérdidas		0,40
<b>Total</b>	<b>58,66</b>	<b>58,66</b>



c) Depósito

Después se recibe el fermentador y se procede a su destilación.

**Tabla 11:** Depósito del fermentado

<b>Materiales</b>	<b>Entrada (Kg)</b>	<b>Salida (Kg)</b>
Agua	38,87	38,50
Alcohol	8,20	7,88
Residuos	2,20	2,17
Pérdidas		0,79
<b>Total</b>	<b>49,29</b>	<b>49,27</b>

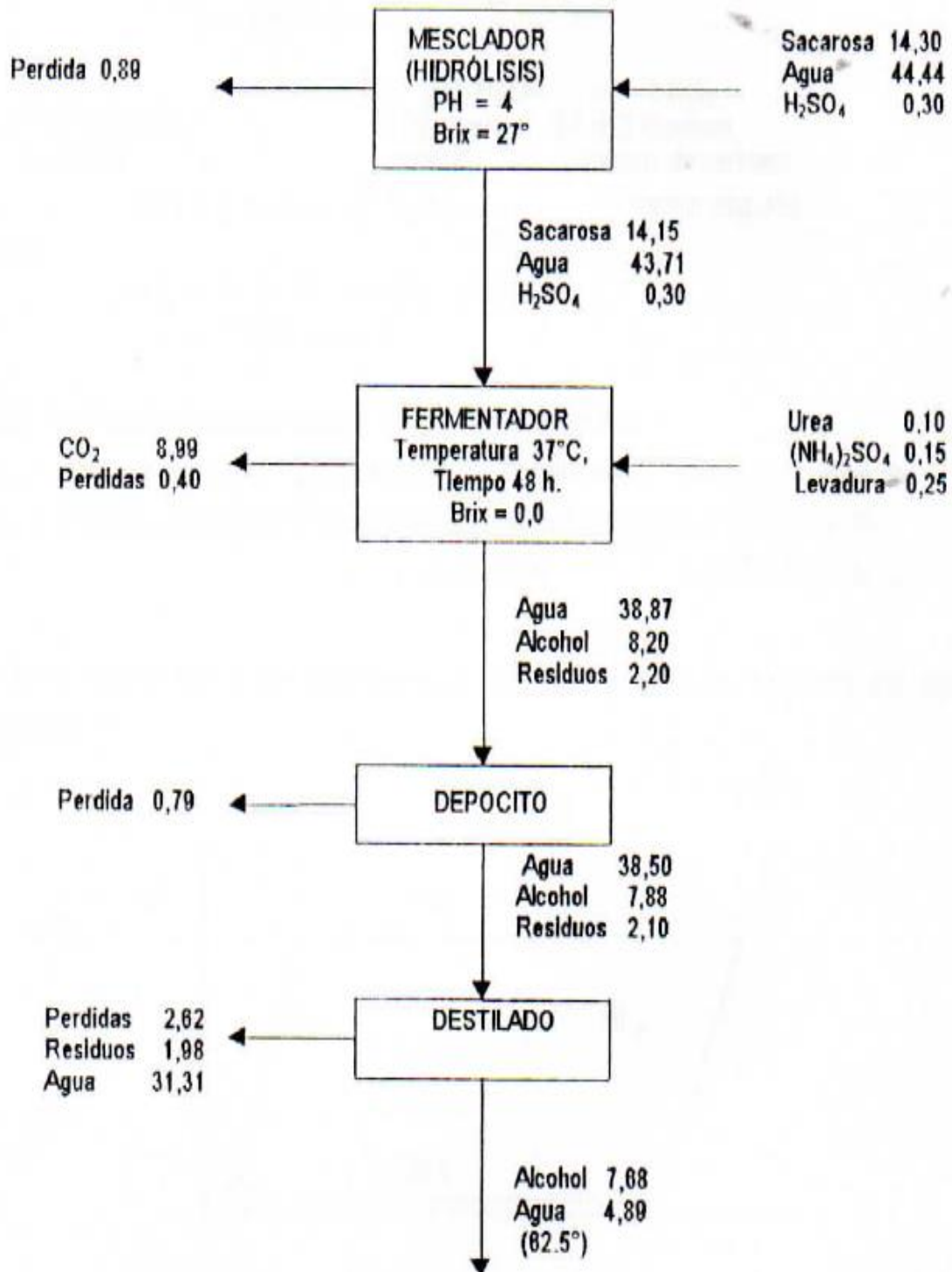
d) Destilado

La destilación se realiza en el destilador del laboratorio de operaciones de la FIQ.

**Tabla 12:** Proceso de destilado

<b>Materiales</b>	<b>Entrada (Kg)</b>	<b>Salida (Kg)</b>
Agua	38,50	36,20
Alcohol	7,88	7,68
Residuos	2,10	1,98
Pérdidas		2,62
<b>Total</b>	<b>48,48</b>	<b>48,48</b>

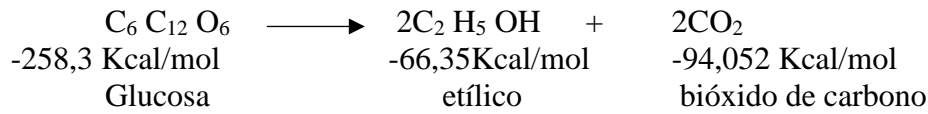
La cantidad es 7,68 Kg. de alcohol etílico obtenido en el proceso en litros 9,498 litros a una concentración de 62,5 grados de alcohol.



**Figura 17:** Diagrama de flujo cuantitativo en kilogramos



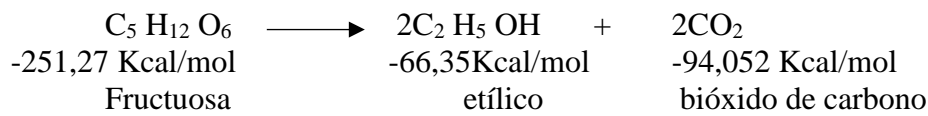
#### 4.1.2. Balance de energía



$$\Delta H_R^{\circ} = \sum n_p \Delta H_{PF} - \sum n_R \Delta H_{RI} \quad (\text{Valenti pág. 45})$$

Luego:

$$\begin{aligned}
 \Delta H_R^{\circ} &= 2(-66,35 - 94,052) - (-258,30) \\
 &= -62,504 \text{ Kcal/mol}
 \end{aligned}$$



$$\Delta H_R^{\circ} = \sum n_p \Delta H_{PF} - \sum n_R \Delta H_{RI} \quad (\text{Valenti pág. 45})$$

Luego:

$$\begin{aligned}
 \Delta H_R^{\circ} &= 2(-66,35 - 94,052) - (-251,27) \\
 &= -69,534 \text{ Kcal/mol}
 \end{aligned}$$

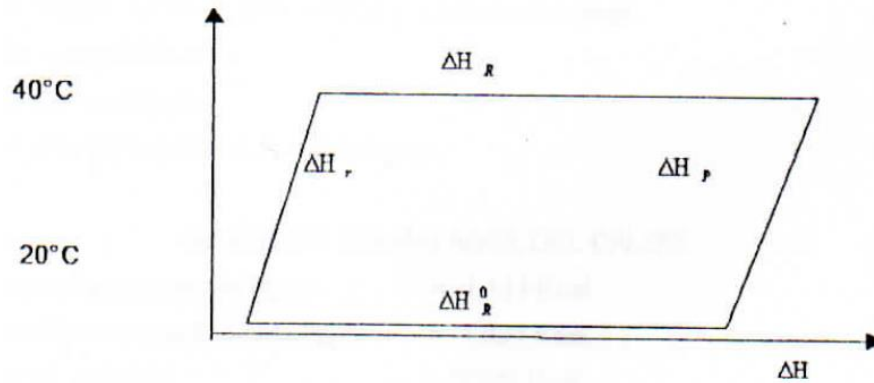
#### Calor liberado para la conversión del azúcar en alcohol etílico.

$$Q_{R,1} = 7,526 \text{ Kg. glucosa} \times 1 \text{ Kmol.glucosa}/180\text{Kg.glucosa} = -2,613 \text{ Kcal/carga}$$

$$Q_{R,1} = 7,526 \text{ Kg. fructuosa} \times 1 \text{ Kmol.fructuosa}/180\text{Kg.frutuosa} = -2,907 \text{ Kcal/carga}$$

$$\text{El calor total} = -5,520 \text{ Kcal/carga}$$

**Calor de reacción a las condiciones de operación a 37 °C**, se hace uso del siguiente diagrama:



**Figura 18:** Calor de reacción a las condiciones de operación a 37 °C

$$\Delta H_R = \Delta H_R^0 - \Delta H_r - \Delta H_r \quad (\text{Valenti pág. 46})$$

### Cálculo del calor de calentamiento de los reactantes

$$Q_r = \Delta H_r - m C_p \Delta T \quad (\text{Valenti pág. 48})$$

Donde:

$m$  = Cantidad de agua 44, 44 litros

$C_p$  = Cantidad calorífica de reactantes

$\Delta T$  = Diferencia de temperatura (15 a 40) °C

$$Q_r = 44,44 \text{ Kg. } (1)(40 - 15)$$

$$Q_r = 1\ 111 \text{ Kcal/carga}$$

### Cálculo del calor necesario para la sacarosa

$$Q_r = \Delta H_r - m C_p \Delta T \quad (\text{Valenti pág. 48})$$

$m_r$  = Cantidad de sacarosa 28,6 Kg.

$C_r$  = Cantidad calorífica calorífico 1,5

$\Delta T$  = Diferencia de temperatura (15 a 40) °C

$$Q_r = 28,6 \text{ Kg. } (1,5)(40 - 15)$$

$$Q_r = 1\ 001 \text{ Kcal/carga}$$



### Calor requerido en el fermentador

Calor total = Calor para el agua + calor para la sacarosa + calor de reacción

Calor total =  $1,111 + 1,001 - 5,520 = 3,408$  Kcal/carga

Calor por pérdida 20%

Calor por pérdida 5%

Calor requerido total = 4,260 Kcal/carga

#### RESUMEN DEL BALANCE DEL CALOR

Calor requerido = 1,111 Kcal.

Calor requerido para la sacarosa = 1,001 Kcal.

Calor de reacción = -5,520 Kcal.

Calor por pérdidas = -0,852 Kcal.

Calor total requerido por carga -4,2260 Kcal.

### 4.1.3. Cálculo del volumen del reactor

Considerando la proporción entre la altura, el diámetro para una estabilidad del cilindro es 1.75 o 7/4, se considera las dimensiones siguientes.

#### DIMENSIONES

- Altura del cilindro = 70 cm
- Altura del fondo = 10 cm
- Diámetro = 40 cm

El volumen del cilindro

$$V = \text{Pi} r^2$$

$$V = \text{Pi} (70) (20)^2 = 87\,964.594 \text{ cm}^3$$

$$V = 87.965 \text{ l.}$$



El volumen del fondo

$$V = \text{Pih} (3a^2 + 3b^2 + b^2) / 6 =$$

$$V = \text{Pi} (10) (3 \cdot 20^2 + 3 \cdot 10^2) = 8\,377.58 \text{ cm}^3$$

$$V = 8.3781 \text{ l.}$$

Volumen total = volumen total + volumen del fondo

$$V = 87.965 + 8.378 = 96.344 \text{ litros.}$$

#### 4.1.4. Calcular el espesor de las pares del reactor

##### 4.1.4.1 Presión del diseño (pd)

Esta presión (PD) debe ser en todo caso mayor a la máxima que se pueda producir en cualquier momento de operación presión máxima de operación: 2.06 Kg/cm<sup>2</sup>

$$PD = 1.1 * 2.066 \text{ Kg/cm}^2 = 2.273 \text{ Kg/cm}^2 = 32.35 \text{ lb/plg}^2$$

##### 4.1.4.2 Temperatura

$$T = \text{temperatura máxima de operación} = 120^\circ\text{C}$$

$$T = 120 + 20 = 140^\circ\text{C} = 284^\circ\text{F}$$

##### 4.1.4.3 Cálculo del espesor de la pared

Para calcular el espesor se hace uso de la ecuación dad por ASME y manual del Ing. Químico 7ta edición:

$$T = \frac{PR}{SE - 0.6p} + C \quad (\text{Perri J. Pág. 1332})$$

Donde:

$$R = \text{Radio interno Puig.} = 7.874 \text{ pl.}$$



- P = Presión de trabajo = 32.35 lb/plg<sup>2</sup>
- E = Eficiencia de la junta = 80%
- T = Espesor plg.
- C = Espesor por corrosión abrasión = 0.02plg

$$T = (32.35 \times 7874) / (15700 \times 0.8 - 0.6 \times 32.35) + 0.02 = 0.0403 \text{ plg} = 1/16 \text{ plg}$$

#### 4.1.4.4 Espesor del cabezal torio esférico asme

De acuerdo con el código ASME, el espesor se calcula por la siguiente formula

$$T = \frac{PLM}{2SE - 0.2P} + C \quad (\text{Perri J. Pág. 1332})$$

Donde:

M= Es un factor que depende de la proporción

$$(L = \text{radio interno del fondo})(r = \text{radio interno de las curvas}) = (0.4) / (0.06 * 0.4) = 16.66$$

La corresponde M=1.77 según la tabla 1.4.2 del código ASME, reemplaza

$$T = (32.35 \text{ lb/plg}^2 * 15.74 \text{ plg} * 1.77) / (2 * 15700 * 0.8 \text{ lb/plg}^2 - 0.2 * 32.35 \text{ lb/plg}) + 0.02 \text{ plg} = 0.056 \text{ plg.}$$

$$T = 1/16 \text{ plg}$$

#### 4.1.5. Calculo del sistema de agitación

a) Objetivos:

- Agitador para aumentar la transferencia de calor
- Mantener en suspensión la biomasa





b) Datos:

- Medio de cultivo: melaza
- Densidad =  $1.1147 \text{ g/cm}^3 = 114,7 \text{ Kg/m}^3$
- Viscosidad =  $0.00237 \text{ Kg/m.s}$

c) Dimensiones del reactor

$$V_L = 60 \text{ L} = 0.06 \text{ m}^3$$

$$D = 0.40\text{m}$$

Determinar de velocidad en volumen  $V_v$

El valor de  $V_v$  (m/s) esta diseccionado por el nivel de agitación exigido, para la obtención de los resultados deseados.

$$V_v = 0.08 \text{ m/s proporciona un mínimo de movimiento del liquido}$$

d) Calculo del diámetro equivalente, ( $Deq$ ) se toma como base un cilindro cuya altura sea igual al diámetro.

$$Deq = (4 \cdot V / \pi)^{1/3} = (4 \cdot 0.06 / 3,1416)^{1/3} = 0.42\text{m}$$

e) Calculo del área transversal,  $A$

$$A = (\pi/4) (Deq)^2 = (3.1416/4 (0.42))^2 = 0.1385\text{m}^2$$

f) Calculo de la capacidad de bombeo del impulsor

$$Q = V_v \times A = 0.08 \text{ m/s} (0.1385\text{m}^2) = 0.01108 \text{ m}^3/\text{s}$$

g) Selección del tipo de impulsor

Se selecciona un agitador de paletas de flujo axial, empleado en fermentador para cultivos celulares.

- Relación ancho/ diámetro del impulsor:  $W/D_a = 1/5$
- Relación del diámetro del impulsor/ diámetro del tanque:
- $Da = (D_a/D_t) Deq = (0.50) (0.42\text{m}) = 0.21\text{m}$



h) Cálculo del ancho del impulsor

$$W/D_a = 1/5$$

$$\text{Luego: } W = D_a / 5 = 0.21 / 5 = 4\text{cm}$$

i) Cálculo del número de potencia

Se asume 250 rpm = 4,17 rps. Cálculo del Re.

$$Re = \frac{D_o^2 NP}{\mu} = 0,0441 \times 4,17 \times 1114,7 / 0,00237 = 86\,494 \quad (\text{D.Kern. Pág. 180})$$

P= número de potencia

Con el Re = 86494 y la figura de Scragg se tiene, que P = 5

j) Cálculo de la potencia del impulsor

$$P_a = \frac{P_p N^3 D_a^5}{g_c} = 5 \times 1114,7 \times (4,17)(0,21)^5 / 1(\text{Kg} - \text{m/M} - \text{s}^2) = 165,056 \text{ N-m/s}$$

k) Cálculo de la potencia del motor, Pm

$$P_m = P_a / 0,8 = 165,056 / 0,8 = 206,32 \text{ N-m/g (1Hp)} / (745,7 \text{ N-m/s}) = 206,32 \text{ N-m/s} = 0,277 \text{ HP}$$

Se especifica un motor de 0,5 HP colocado en forma vertical.

#### 4.1.6. Cálculo del sistema de calentamiento

- *Volumen del fluido calefactor:*

Vf = Volumen del tanque externo – volumen del reactor

$$V_f = \left[ H_{ch} \frac{D_{ch}^2}{4} + 0,0809 D_{ch}^3 \right] - \left[ H_c \frac{D_c^2}{4} + 0,0809 D_c^3 \right]$$



Donde:

$H_{ch}$  = Altura de la parte cilíndrica de la chaqueta

$D_{ch}$  = Diámetro interno de la chaqueta

$H_c$  = Altura de la parte cilíndrica del reactor

$D_c$  = Diámetro externo del reactor

$$H_{ch} = 0,50 + 0,08 = 0,58m$$

$$D_c = 0,40m + 0,0016 = 0,4016m$$

$$D_{ch} = 0,4016 + 2(0,10) = 0,6016m$$

$$V_f = \left[ 0,58 \frac{\pi (0,6016)^2}{4} + 0,0809(0,6016)^3 \right] - \left[ 0,7 \frac{\pi (0,4016)^2}{4} + 0,0809(0,4016)^3 \right] = 0,0229m^3$$

- **Cálculo en la chaqueta:**

$Q_{chaqueta} = Q_{reactor} + Q_{pérdida} + \text{serpentín}$

$Q_{reactor}$  = Calor ganado por el medio del cultivo: Melaza diluida

Temperatura inicial del medio = 15 °C

$C_p$  melaza diluida = 0,29 Kcal/Kg °C

$Q_{reactor} = 1114,7 \text{ kg/m}^3 \times 1,214 \text{ Kj/Kg.K}(30)$

$Q = 2435,84 \text{ Kj} = 581,873 \text{ Kcal.}$

Calor de chaqueta = calor del reactor + serpentín = 2435,84Kj = 581,873Kcal = 15 Psl

- **Cálculo de la cantidad de vapor para el calentamiento:**

$$Q_{cha + serp} = M_v (H_v - H_l) \quad (\text{Valeenti A. Pág. 254})$$

$H_v$  = 646,0 Kcal/Kg a presión de 15 psl

$H_l$  = 120,3 Kcal/Kg a presión de 15 psl

$$581,873 \text{ Kcal} = M_v (646,0 - 120,3) \text{ Kcal/Kg}$$

$M_v = (581,873 \text{ Kcal}) / (646 - 120,3) \text{ Kcal/Kg} = 1,1068 \text{ Kg de vapor}$



#### 4.1.7. Cálculo del sistema de enfriamiento

##### - DATOS

**Medio de cultivo:** Melaza diluida

Temperatura inicial  $T_1 = 120\text{ }^\circ\text{C}$

Temperatura final  $T_2 = 37\text{ }^\circ\text{C}$

Altura del líquido  $HL = 0,52\text{ m}$

Temperatura de salida  $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$

Fluido refrigerante del agua a la temperatura de ingreso  $T = 15\text{ }^\circ\text{C}$

##### **Cantidad de agua necesaria para el enfriamiento:**

$$M_w = \frac{Q_w}{C_p W \Delta T}$$

Donde:

$M_w =$  Cantidad de agua

$Q_w = 2907,294\text{ Kcal}$  (balance de energía)

$\Delta T = 35\text{ }^\circ\text{C} - 15\text{ }^\circ\text{C} = 20\text{ }^\circ\text{C}$

Luego:

$$M_v = (2907,294\text{ Kcal})(1\text{Kg }^\circ\text{C} \times 20\text{ }^\circ\text{C}) = 145,365\text{ Kg/carga}$$

##### **Cálculo de aguas provenientes de la red de distribución de la UNA -Puno:**

$V = 0,06\text{ l/s}$

Diámetro interno del tanque  $D_i = 0,40\text{ m}$

Diámetro externo del tanque  $D_c = 0,4016\text{ m}$

Diámetro interno de la chaqueta  $D_{ch} = 0,6016\text{ m}$

Conductividad AISI 304  $K_a = 16,282\text{ W/m }^\circ\text{C}$

Espesor de la pared  $t = 0,0016\text{ m}$

Diámetro del agitador  $D_a = 0,21\text{ m}$

Número de revoluciones  $N = 4,17\text{ rps}$



## - SISTEMA AGITADOR

a) *Cálculo del coeficiente convectivo del fluido orgánico de hl*

Temperatura media de la melaza diluida

$$T_m = (T_1 + T_2)/2 = 120 + 34/2 = 77 \text{ }^\circ\text{C}$$

Temperatura media del fluido refrigerante: Agua suponiendo una temperatura de salida del agua.

$$T_2 = 34 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$T_m = (T_1 + T_2)/2 = (15 + 34)/2 = 24,5 \text{ }^\circ\text{C}$$

Temperatura de la pared ( $T_w$ )

$$T_w = (T_m + T_m)/2 = (77 + 24,5)/2 = 50,75 \text{ }^\circ\text{C}$$

Temperatura de la película interna ( $T_f$ )

$$T_f = (T_m + T_w)/2 = (77 + 50,75)/2 = 63,87 \text{ }^\circ\text{C}$$

Cálculo de  $h_i$  para recipientes son agitación (Chopoy - Micks)

$$\frac{H_i D_f}{K} = 1,62 \left[ \frac{D N_p}{\mu} \right]^{2/3} \left[ \frac{D_p \mu}{K} \right]^{1/3} \left[ \frac{\mu}{\mu_w} \right]^{0,14}$$

Propiedades generales de la melaza diluida:

P	= 1114,7
$\mu$	= 0,00237 Kg/m.s
Cp	= 1213,65 J/Kg $^\circ\text{C}$
K	= 0,5582 W/m $^\circ\text{C}$

$$(\mu/\mu_m)^{0,14} = 1 \quad (\text{Kem D. Pág. 180})$$

Reemplazando datos:

$$\frac{H_i(0,4)}{0,558} = 0,62 \left[ \frac{0,21^2 \times 4,17 \times 1114,7}{0,00237} \right]^{2/3} \left[ \frac{1213,65 \times 0,00237}{0,5582} \right]^{1/2} \quad (1)$$

$$h_i = 3063,492 \text{ W/m}^2 \text{ }^\circ\text{C}$$



b) *Cálculo del coeficiente convectivo del agua (convección forzada)  $h_o$*

$$Ho = \frac{MaK}{Dc} \quad (\text{Kem D. Pág 210})$$

### **Cálculo del área transversal de la chaqueta**

$$At = \left[ \frac{D_2}{ca} - \frac{D_1}{ca} \right] p_i = \left[ \frac{0,6016^2 - 0,4016^2}{2} \right] p_i = 0,157 \text{ m}^2 \quad (\text{Kern D. Pág 210})$$

Temperatura de película exterior (tf)

$$T_f = (T_m + T_w)/2 = (24,5 + 50,75)/2 = 37,625 \text{ }^\circ\text{C}$$

Propiedades del agua a tf (Gean Kopolls)

$$\rho = 995,68 \text{ Kg/m}^3$$

$$\mu = 0,0008 \text{ Kg/m}$$

$$C_p = 4181 \text{ J/Kg }^\circ\text{C}$$

$$K = 0,628 \text{ W/m }^\circ\text{C}$$

### **Cálculo de la velocidad másica con que el agua atraviesa a la chaqueta**

$$G = v\rho = (0,00006 \text{ m}^3/\text{s} \times 995,68 \text{ Kg/m}^3)/0,157 \text{ m}^2 = 0,379 \text{ Kg/m}^2$$

### **Cálculo del número de reinos (Re)**

$$Re = \frac{DcG}{\mu} = \frac{0,4016 \text{ m} \times 0,379 \text{ Kg/m}^2 \text{ s}}{0,0008 \text{ Kg/m.s}} = 190,258 \quad (\text{Kern D. Pág 210})$$

### **Cálculo del número de Prandic (Pr)**

$$Pr = \frac{C_p \mu}{K} = \frac{4181 \text{ J/Kg }^\circ\text{C} \times 0,0008 \text{ Kg/m.s}}{0,628 \text{ W/m. }^\circ\text{C}} = 5,33 \quad (\text{Kern D. Pág. 211})$$

### **Cálculo del número de Nusselt**

$$Nu = C \times R^{0,466} \times Pr^{0,333}$$



Donde C y m son constantes en función del Re y la tabla de Gean Kopolis, se tiene que: C = 0,863 y m = 0,466

$$Nu = 0,863 (190,258)^{0,466} (5,33)^{0,333} = 19,40$$

### **Cálculo del coeficiente convectivo**

$$h_o = (19,4 \times 0,628 \text{ W/m} \cdot \text{°C}) / 0,4016 \text{ m} = 30,34 \text{ W/m}^2 \text{ °C}$$

c) *Cálculo del coeficiente global de transferencia de calor U*

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_i} + \frac{t}{K_o} + \frac{1}{h_o} = \frac{1}{3063,492} + \frac{0,0016}{16,2816} + \frac{1}{30,34} = 0,033 \text{ W/m}^2 \text{ °C} \quad (\text{Kern D. Pág 230})$$

$$U = 29,954 \text{ W/m}^2 \text{ °C}$$

d) *Cálculo del área medio de transferencia de calor (ATC)*

$$ATC = A_{cilindro} + A_{base}$$

$$ATC = \Pi \frac{(D_c + D_f)}{2} H_c + 0,912 \frac{(D_c + D_f)^2}{2} \quad (\text{Kern D. Pág 240})$$

$$ATC = 3,1416 \frac{(0,4016 + 0,4)}{2} 0,7 + 0,912 \frac{(0,4016 + 0,4)^2}{2} = 1,064 \text{ m}^2$$

### **4.1.8. Cálculo del serpentín**

#### **1. Función:**

Como sistema de calentamiento y esterilización del bioreactor, y como sistema de enfriamiento, para mantener la temperatura de fermentación.

#### **2. Datos:**

Flujo de agua: 0,00056 Kg/s	= 2,016 Kg/h
Diámetro interno de la tubería	= 0,391 plg
Diámetro exterior de la tubería	= 0,5 plg
Temperatura media del agua de (15 + 35)/2	= 25 °C enfriamiento
Material de construcción del serpentín tubo de cobre	= 9 m



### 3. Cálculo del coeficiente global de transferencia de calor:

Calculo del coeficiente de película interna se hace uso de la siguiente ecuación

$$\frac{K_1 \phi_1}{K} = (1 + 3,5 \frac{\phi_1}{\phi_c}) 0,023 \frac{(\phi_1 G)}{\mu} \left( \frac{C_P \mu}{K} \right)^{0,4} \quad (\text{Kern D. Pág 254})$$

Donde:

$h_1$  = Coeficiente de película interna, BTU/h.pie<sup>3</sup>°F

$\phi_1$  = Diámetro interno del serpentín = 0,033 pies

$\phi_c$  = Diámetro del helicoide de la tubería = 1,0 pies

$K$  = Conductividad térmica del agua = 0,34 BTU/h.pie°F

$\mu$  = Viscosidad del agua = 2,61 lb/h.pie

$G$  = Velocidad másica = (masa del agua)/(área transversal)

$$G = (2,016 \text{Kg/h} \times 2,2 \text{lb/Kg}) / (0,000855 \text{pie}^2) = 5185,557 \text{ lb/ pie}^2 \text{h}$$

Reemplazando los datos:

$$\frac{h_1 0,033}{0,34} = (1 + 3,5 \frac{0,033}{1}) 0,023 \frac{(0,023 \times 5185,557)}{2,61} \left( \frac{1 \times 2,61}{0,34} \right)^{0,4}$$

$$h_1 = 39,165 \text{ BTU/h.pie}^2 \text{°F}$$

Calculo del coeficiente de película exterior

$$H_o = \frac{K}{0,00134 L_v} \frac{(\phi_c P)^{0,5}}{\mu} \frac{(d_g)^{0,8}}{d_r} \frac{(\phi_c L_v)^{0,1}}{\phi_o^3} \quad (\text{Kern D. Pág 260})$$

Para la solución fermentada a 37°C

$p$  = 66,456 lb/ h.pie<sup>3</sup>

$K$  = 0,338 BTU/h.pie°F

$\mu$  = 4,417 lb/ pie.h

$\phi_c$  = 1,0 pie

$d_g$  = espacamiento entre espiras: 1,0plg = 0,0833 pies

$d_p$  = altura del serpentín : 1 pie

$L_v$  = longitud del lado del tanque (altura) = 0,40m = 1,312 pies

$\phi_o$  = Diámetro externo de la tubería = 0,5 plg = 0,0417





Reemplazando los datos:

$$H_o = \frac{0,338}{0,00134 \times 1,312} \frac{(1^2 \times 66,456)^{0,5}}{4,4171} \frac{(0,083)^{0,8}}{1} \frac{(1^2 \times 1,312)0,1}{0,0417} = 1177,2 \text{ BTU/h.pie}^2\text{°F}$$

Calculo del coeficiente global de transferencia de calor U

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{h_o} + \frac{1}{h_1} \times \frac{\phi_o}{\phi_1} + R_1 \frac{\phi_o}{\phi_1} + R_o \quad (\text{Kern D. Pág. 279})$$

Donde:

$R_o$  = Resistencia exterior (costra) = 0,0004 h.pie<sup>2</sup>°F/BTU

$R_1$  = Resistencia interior (costra) = 0,0002 h.pie<sup>2</sup>°F/BTU

Reemplazando los datos se tiene:

$$\frac{1}{U} = \frac{1}{1177,2} + \frac{1}{89,165} \times \frac{0,391}{0,5} + 0,0002 \times \frac{0,391}{0,5} + 0,0004$$

$$U = 46,79 \text{ BTU/h.pie}^2\text{°F}$$

#### 4. Cálculo del área de refrigeración:

Cantidad de calor para retirar de la solución: 5520,656 Kcal/carga

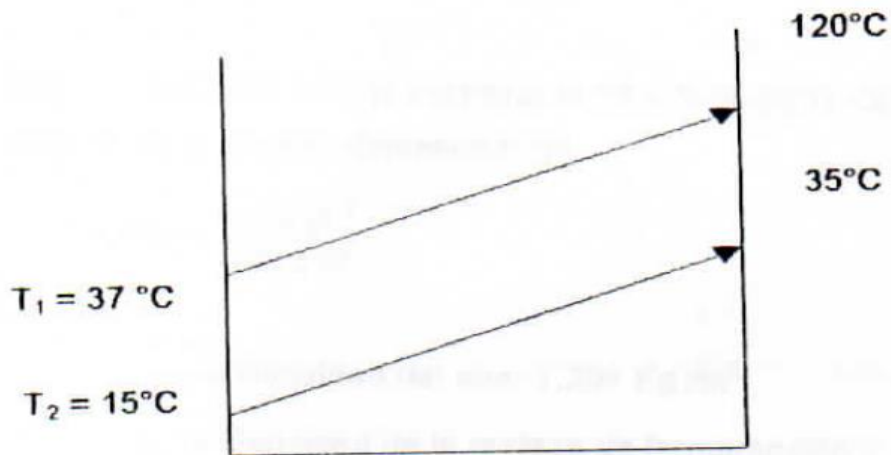
Cantidad de calor: 5520,656 Kcal/h de fermentación

$$5520,656 \text{ Kcal/h} \times 3,9657 \text{ BTU/Kcal} = 21893,266 \text{ BTU}$$

Se asume que el serpentín enfría la mitad del calor:

$$Q_{\text{serp}} = 21893,266/2 = 10946 \text{ BTU/h}$$

Calculo de la fuerza impulsora de la temperatura



**Figura 19:** Calculo de la fuerza impulsora de la temperatura

Calculo del área de refrigeración:

$$A = \frac{Q}{U\Delta T_m} = \frac{10946 \text{ BTU/h}}{46,79 \frac{\text{BTU}}{\text{h} \cdot \text{pie}^3 \text{°F}} \times 84,23 \text{°F}} = 2,7774 \text{ pie}^2$$

Área exterior por pie de tubería de serpentín de refrigeración: 0,131 pie<sup>2</sup>/pie de tubería

Longitud de la tubería (L)

$$L = \frac{2,7774 \text{ pies}^2}{0,131 \frac{\text{pie}^2}{\text{pie.de.tubo}}} = 21,20 \text{ pie.de.tubo}$$

Tubería comercial de cobre: 6,5m (21,32pies)

Calculo del número de espiras.

$$N = \frac{L}{\pi \phi c} = \frac{21,2 \text{ pies}}{3,14,16 \times 1 \text{ pie}} = 6,75 \text{ espiras}$$

#### 4.1.9. Cálculo de la potencia del bombeo de aire

a) Calculo de la presión dinámica (HV)

$$H_v = \frac{100 p_a V^2}{2g p_m 60}$$



Donde:

$$\rho_a = \text{Densidad del aire: } 1,204 \text{ Kg/m}^3$$

$$\rho_m = \text{Densidad de la melaza de fermentación: } 1114,7 \text{ Kg/m}^3$$

$$g = \text{Aceleración de la gravedad: } 9,81 \text{ m/s}^2$$

$$V = \text{Velocidad de aire: } 50 \text{ m/min} = 0,833 \text{ m/s}$$

Reemplaza:

$$H_v = (100 \times 1,204 \times 0,833)^2 / 2 \times 9,81 \times 1114,7 \times 60 = 6,367 \times 10^5 \text{ cm de agua.}$$

b) Calculo de la presión total

$$H_t = H_s + H_v$$

$$H_t = \text{Presión total del agua}$$

$$H_s = \text{Presión estática: } 15 \text{ cm de agua}$$

$$H_v = 6,36 \times 10^3 \text{ cm agua}$$

Luego:

$$H_t = 15 + 6,367 \times 10^3 \text{ cm agua}$$

c) Calculo de la potencia del ventilador (P)

$$P = \frac{qH\rho_m}{100 \times 4560} \quad (\text{Perry J. Pag.2250})$$

Donde:

$$Q = \text{Fluido volumétrico del aire}$$

$$Q = 20 \text{ m}^3/\text{min}$$

Reemplazando:

$$P = (20 \times 15,0000636 \times 1114,7) / (100 \times 4560) = 0,733 \text{ hp}$$

Teniendo en cuenta un rendimiento de 75% se tiene:

$$P = (0,733) / (0,75) = 1,0 \text{ hp}$$

Se especifica inyectar el aire por medio de una compresora de 1,0 hp



#### 4.1.10. Requerimientos para la construcción del fermentador

En la construcción del fermentador tipo Batch requiere los materiales siguientes:

- Una plancha de acero inoxidable del tipo 304 1/16" de espesor
- Una plancha negra de 1/8 de pulgadas de espesor
- Diez metros de tubo de cobre con un diámetro de ½"
- Un motor eléctrico de 0,5 hp
- Un manómetro de presión de vapor
- Una termocupla
- Tubo de 2" de diámetro para los soportes
- Tubo galvanizado para las entradas y salidas de vapor
- Poleas de aluminio
- Agitador de acero inoxidable
- Válvulas de paso
- Rodamientos
- Electrodo del punto azul celcoor AP
- Electrodo de acero inoxidable
- Correa para la transmisión del movimiento del motor
- Pintura
- Lijar
- Otros (pernos, cables, teflón, etc)

## 4.2 MONTAJE DEL EQUIPO

### 4.2.1. Especificaciones del equipo

Clasificación	: Bio-reactor de tanque agitador para cultivo disperso
Modelo	: Batch
Capacidad total	: 96 litros
Capacidad de trabajo	: 40 – 60 litros
Material	: Acero inoxidable tipo 304
Acabado	: Pulido



Cabezal superior	: Torio esférico ASME
Cabezal inferior	: Torio esférico ASME
Diámetro del cilindro	: 0,40m
Altura del recipiente	: 0,70m
Diámetro de la chaqueta:	0,60m
Relación	: H/D : 1,75
Presión del vapor	: 5psi.
Termocupla	: 0° a 200°C
Sistema de agitación	: Motor de 0,5 hp

#### **4.2.2. Área del trabajo recomendable**

Para determinar el área de trabajo se debe de tomar en cuenta lo siguiente:

1. Ambiente aséptico, es decir que sea fácil de limpiar y desinfectar.
2. Un lugar cercado para evitar la contaminación.
3. Que esté libre de humedad, la humedad crea un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos.
4. Que cuente con servicios básicos de luz, agua y desagüe.
5. La esterilización del equipo se realiza en el mismo lugar.
6. Debe contar con los instrumentos y materiales de laboratorio necesarios.
7. Debe tener ventilación el lugar de operación.
8. El área del fermentador para la operación requiere cuatro metros cuadrados.
9. El área para la preparación del mosto requiere cuatro metros cuadrados.
10. El área para la ubicación del compresor requiere cuatro metros cuadrados.
11. El área para reactivos y depósito de mosto y melaza requiere cuatro metros cuadrados.
12. El área total que requiere el fermentador para su operación correcta es de 16 metros cuadrados.



### 4.2.3. Operación

Se debe de seguir los siguientes pasos:

1. Verificar que el fermentador este totalmente limpio y seco.
2. Verificar que las conexiones del ingreso del vapor estén bien conectadas.
3. Las llaves de entrada y salida estén en buenas condiciones.
4. Introducir el mosto preparado para fermentar por la parte superior de ingreso.
5. Elevar la temperatura por medio del serpentín y la chaqueta a 40°C
6. Encender el agitador con la tapa cerrada
7. Abrir el ingreso del aire
8. Mantener el agitador encendido cuando está a una temperatura de 36 a 40°C y tenerlo operando durante 4 horas.
9. Cerrar las entradas de vapor del serpentín y la chaqueta cuando la temperatura se encuentra por encima de los 40°C
10. Apagar el agitador cuando se llega a 37°C
11. Cerrar el ingreso del aire
12. El tiempo del fermentador es 48 horas
13. Abrir la salida de la parte inferior y descargar todo el material fermentado
14. Destilar el alcohol en tipo columna
15. Recibir el alcohol destilado para una posterior desestilación

### 4.2.4. Mantenimiento

1. Lavar con el chorro del agua del grifo hasta quitar todos los residuos que quedan en el interior del fermentador.
2. Expulsar las aguas que se condensan dentro de la chaqueta y del serpentín por la parte inferior de salida.
3. Luego se seca con el aire de la compresora y con el mismo calor de la chaqueta.
4. Desconectar la entrada de energía eléctrica y tenerlo siempre seco
5. Tenerlo apagado la termocupla y solo encender cuando entra en funcionamiento.
6. No raspar el tubo de cobre ni el acero inoxidable porque se producen óxidos



#### 4.2.5. Normas de seguridad

1. Antes de poner en marcha el sistema, verificar las conexiones eléctricas, que la chaqueta contenga la cantidad de agua necesaria y las conexiones de descarga se encuentren abiertas.
2. Evitar derrame de líquido en el área de los componentes eléctricos.
3. El fermentador no debe ser usado para procesos químicos que utilicen sustancias químicas fuertes, que no estén de acuerdo con los materiales de construcción utilizados.
4. No operar el reactor a presiones mayores de 3atm., por razones de seguridad.
5. No limpiar el tanque con sustancias corrosivas como ácidos, tales como clorhídrico y sulfúrico concentrado, o con escobillas gruesas, ya que pueden destruir la capa de óxido de cromo que protege el acero.
6. Utilizar implementos de seguridad durante el manejo del equipo, con las sustancias químicas de limpieza.
7. No hacer caer líquidos ni exponer el motor a ambientes húmedos.
8. La temperatura del fermentador se debe de mantener durante la operación de fermentación a 37°C.
9. La presión de vapor mantener de 3 a 5 psi. para mantener la temperatura de operación.
10. El mosto debe de ocupar un rango de 40 a 60 litros dentro del fermentador
11. Después de cada operación lavar siempre el fermentador

### 4.3 EVALUACIÓN ECONÓMICA

#### 4.3.1 Costos directos

El costo directo son los costos de los materiales que intervienen directo en la construcción del fermentador que intervienen en los siguientes materiales que son adquiridos en Puno y Lima y otros materiales son importados tales como la termocupla y los materiales inoxidables.

La construcción se realiza en Puno partiendo de los diseños moldeados, soldados, armado y puesto en funcionamiento.

- a) *Costos de los materiales para el fermentador enchequetado y accesorios*

**Tabla 13:** Cálculo del costo del fermentador

Nombre	Cantidad	Precio unitario (U.S.\$)	Precio total (U.S.\$)
1. Tanque externo	1	450,00	450,00
2. Tanque interno	1	280,00	280,00
3. Soporte del fermentador	1	200,00	200,00
4. Válvulas	5	20,00	100,00
5. Niples	10	5,00	50,00
6. Abrasivos	1	45,00	45,00
7. Teflón	6	1,50	9,00
8. Electrodo celcooor	6 Kg.	7,33	44,00
9. Electrodo inox	4Kg.	30,00	120,00
10. Tubo de cobre	10 m	20,00	200,00
11. Moldeado	2	50,00	100,00
12. Transportes		100,00	100,00
13. Termocupla	1	120,00	120,00
14. Manómetro de vapor	1	40,00	40,00
15. Salida tubo inox de 2" O	1	20,00	20,00
16. Codos, niples y tes		40,00	40,00
SUB TOTAL			1 918,00

**Fuente:** Elaboración propia

*b) Costos para el sistema de agitación*

Materiales para el sistema de agitación de la tabla de acuerdo a la necesidad del fermentador tipo Batch

**Tabla 14:** Costo del agitador y materiales

Nombre	Cantidad	Precio unitario (U.S.\$)	Precio total (U.S.\$)
1. Motor eléctrico	1	200,00	200,00
2. Soporte del motor	1	100,00	100,00
3. Abrazaderas de rodamiento	2	30,00	60,00
4. Rodamientos	2	20,00	40,00
5. Polea	4	15,00	60,00
6. Correa	1	20,00	20,00
7. Eje de inox	1	100,00	100,00
8. Paletas	4	10,00	40,00
9. Cable	1	10,00	10,00
10. Cuchilla	1	10,00	10,00
11. Pernos	8	20,00	20,00
12. Tablero y sistema de control	1	120,00	120,00
13. Transportes		100,00	100,00
SUB TOTAL			860,00

**Fuente:** Elaboración propia



#### 4.3.2 Costos indirectos

Son los costos que se realizan en la construcción del fermentador, pero que no interviene en forma física, se encuentra en las informaciones y otros que se detalla en la tabla.

**Tabla 15:** Costos indirectos

<b>Rubros</b>	<b>Precios (U.S.\$)</b>
- Fax y comunicación para cotización	120,00
- Gastos de adquisición de materiales	250,00
- Gastos de investigación	120,00
- Gastos administrativos	80,00
- Pruebas experimentales	100,00
- Informaciones del tema	250,00
- Informes de folletos	80,00
- Transportes	50,00
<b>Sub total</b>	<b>1 050,00</b>

**Fuente:** Elaboración propia

#### 4.3.3 Balance económico final

En la tabla se muestra el balance económico final de la construcción y puesta en marcha del equipo fermentador.

**Tabla 16:** Balance económico final

<b>Rubros</b>	<b>Precios (U.S.\$)</b>
- Costo directo	2 778,00
- Costo indirecto	1 050,00
<b>Total</b>	<b>3 828,00</b>

**Fuente:** Elaboración propia

El tipo de cambio del dólar con fecha julio de 1999 es de s/. 3,35

#### 4.3.4 Financiamiento

El financiamiento del diseño, construcción y puesta en marcha del equipo, de fermentación es asumida por los tesisistas en su totalidad.



## V. CONCLUSIONES

1. El bioreactor fue construido de acuerdo a los cálculos efectuados en el capítulo V recipientes a presión y su diseño está sujeto a los requerimientos generales de los bio-procesos tales como el acero inoxidable tipo 304, acero negro de 1/8" de espesor y un motor eléctrico de 0,5 hp.
2. Con el equipo, el proceso de fermentación, se acelera en forma considerable y así obtener el alcohol etílico a partir de la melaza de la caña de azúcar.
3. Por una carga 28,6 kilogramos de melaza que contiene 14,3 Kg de sacarosa en el proceso de la fermentación se obtiene el alcohol etílico en una cantidad de 7,67 Kg que en volumen es 9,475 L a una concentración de 62,5 % de pureza.
4. La temperatura de operación adecuada, para el proceso de fermentación en el equipo es de 37°C y un pH 4 a 27° brix.
5. El tiempo de operación es de 48 horas para la obtención del alcohol en una carga.



## VI. RECOMENDACIONES

1. Antes de poner en funcionamiento el equipo se recomienda leer las instrucciones de operación del reactor así como las normas de seguridad.
2. En el proceso de funcionamiento para la fermentación, se debe controlar la temperatura en un rango de 30 a 40°C manteniendo en una temperatura óptima de 37°C.
3. La presión de vapor no debe superar de 3 a 5 psi, mantener solo en 5 psi para no destruir las células que están fermentándose.
4. El volumen de mosto debe ser de 60L. como máximo y 40 L como mínimo porque puede recalentar el serpentín y el mismo fermentador.
5. El reactor se puede usar para la obtención de ácido cítrico, antibióticos, proteínas, yogur y buscar nuevas técnicas de fermentación, etc.
6. Realizar un mantenimiento después de cada operación, limpiarlo siempre con chorros de agua.
7. Evitar rayarlo, puesto que dañaría el material inoxidable.
8. Poner en funcionamiento, cuando este cargado el material y no permitir que este mojada la parte eléctrica.



## MANUAL DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR

1. Verificar que las conexiones estén bien instaladas en especial el vapor de agua y la corriente eléctrica.
2. Verificar que la chaqueta y el serpentín estén totalmente vacíos de agua para que no interfiera el ingreso de vapor y caliente el cilindro interno.
3. Lavar la parte interior del fermentador y esterilizar totalmente y cerciorarse que no queden residuos.
4. Secar en forma total el fondo del fermentador y serpentín
5. Verter la solución preparada teniendo en cuenta que el volumen oscile desde 40 a 60 L, cuidando que no sea mayor ni menor al indicado.
6. Tapar el reactor para que no pierda calor por los flujos de aire frío.
7. Encender el motor eléctrico para que empiece el agitado del mosto y este en homogenización total.
8. Abrir la llave de vapor caliente cuidando que la presión no alcance a 5 psi, esta presión puede oscilar de 3 a 10 psi.
9. Controlar la temperatura para la fermentación que debe alcanzar un máximo de 40°C, para la fermentación de la sacarosa se debe mantener a 37°C en forma constante.
10. Después de la fermentación se debe cerrar el ingreso de vapor y luego apagar el agitador.
11. Abrir la llave de salida donde se recibe todo el fermentado por la parte inferior hasta vaciarlo totalmente.
12. Destapar la tapa superior y lavar totalmente, observando que no quede residuo alguno.
13. Esta listo para operar la carga siguiente, poner en descanso siempre seco y totalmente vacío.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

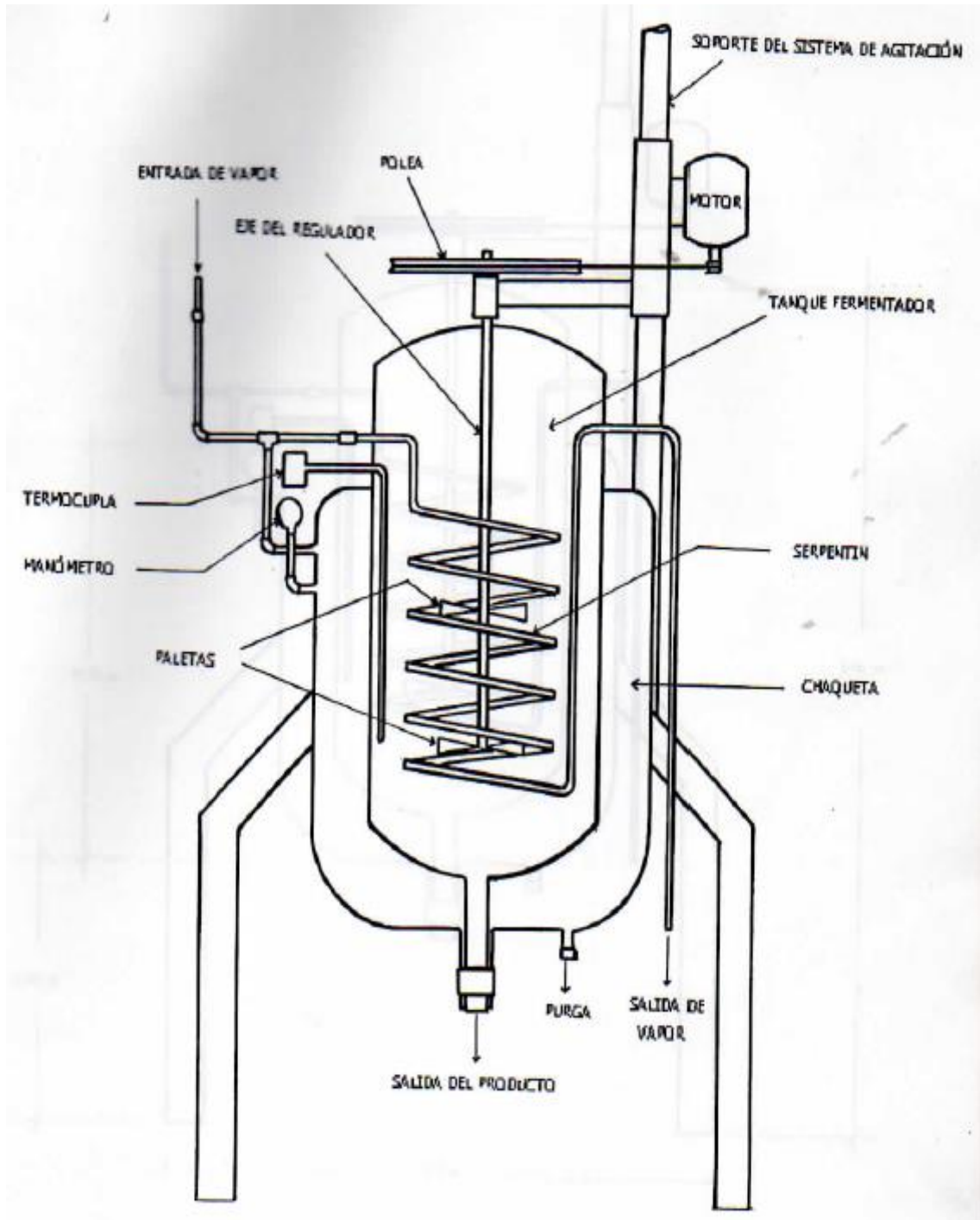
1. ASME 1992 “Boller and pressure code” section VIII
2. ASTM 1990 “Metales handbook” vol 1: Propierties in selecciones: irones, ateels and high performance alloy, American society of metals, Ohio, USA.
3. BARRAW J. 1980 “Ingeniería de proyectos para plantas de proceso” Editorial CECSA, México.
4. BUCKE C. 1966 “Principios de biotecnología” Editorial Mc. Graw – Hill, México.
5. DE LA PEÑA, R. 1981 “Introducción al Análisis Ingenieril de los reactores Químicos” Editorial Limusa S.A. México.
6. DISCOVERY S.A. 1990 “Aceros Inoxidables” Editorial Inca Lima Perú.
7. GARCIA, G. 1993 “Biotecnología de la alimentación” 1ª Editorial Limusa S.A. México.
8. GEAN KOPLIS, 1988 “Proceso de transporte y Operaciones sanitarias” III Editorial CECSA México.
9. GOLD, J. 1985 “Principios de diseño de Equipos de proceso” Editorial Limusa S.A. México.
10. HICKT, G. 1986 “Química” 1ª Edición Limusa S.A. México.
11. KERN, D. 1981 “Procesos de transferencia de calor” Editorial CECSA México.
12. LEVENSPIEL, O. 1985 “El omnilibro de las Reacciones Químicas” Editorial Mac Graw México.
13. METALES, G. 1981 “Principios de Biotecnología” Editorial Limusa S.A. México.
14. MILLER Y MELIK, 1987 “Termodinámica” Editorial Limusa S.A. México.



15. PERRI, R.H 1986 “Manual del Ingeniero Químico” Editorial Limusa S.A.  
México.
16. SGRAGG, A. 1986 “Biotecnología para Ingenieros” Editorial Limusa S.A.  
México.
17. SMITH, J.M. 1986 “Ingeniería de la Ciencia” Editorial Hispanoamericano.  
México.
18. RUIS, R.C 1976 “Proyectos y Construcción de los recipientes a presión”  
Editorial Urmo S.A. España.
19. SILVA, J.L. FLORES, R. CASTILLO, A. 1995 “Guía de prácticas de  
Laboratorio de Transferencia de Masa” U.N.T. Trujillo.
20. VALENTI, A. 1998 “Problemas de Balance de Materia y Energía en la Industria  
Alimenticia” Editorial Limusa S.A. México.



## ANEXOS







# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO

## FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

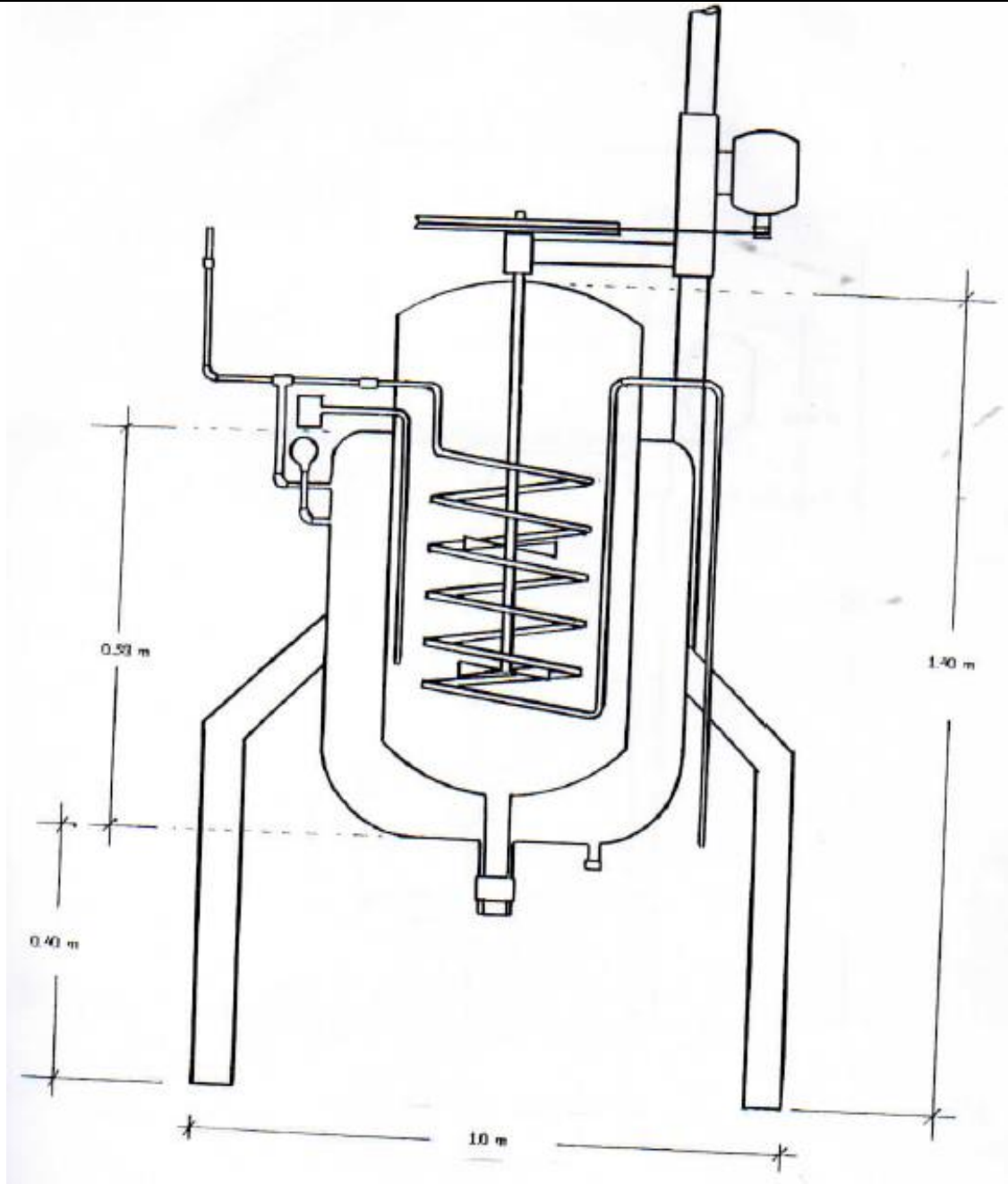
N° 1

REACTOR FERMENTADOR

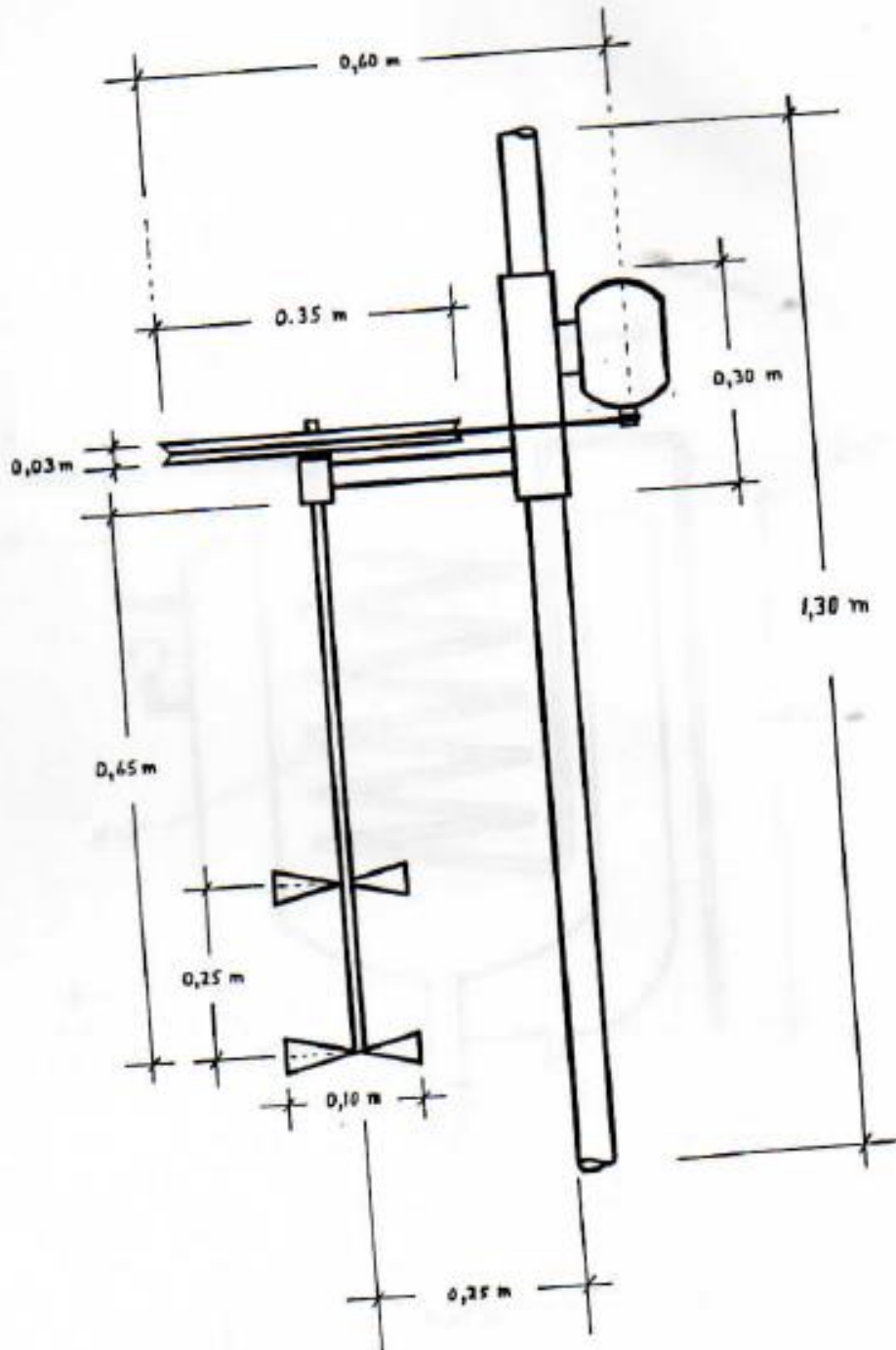
Escala  
1:100

Bach. Ivan NAPOLEÓN Condori Onofre

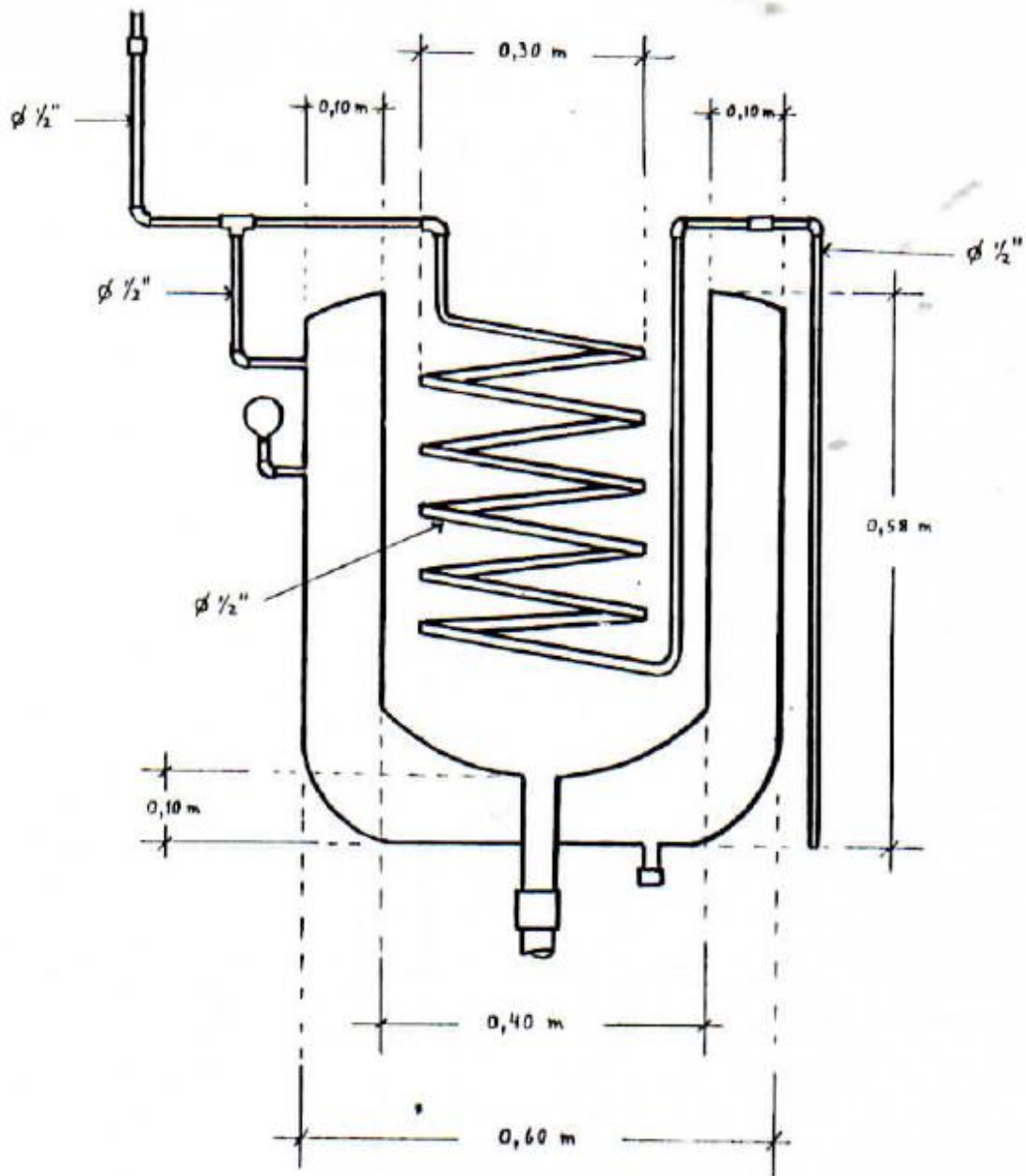
Fecha: 27/01/2000



<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO</b> FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA		
<b>N° 1</b>	<b>DIMENSIONES DE UN REACTOR FERMENTADOR</b>	
<b>Escala</b> 1:100	Bach. Ivan NAPOLEÓN Condori Onofre	<b>Fecha:</b> 27/01/2000



<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO</b> FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA		
<b>N° 1</b>	<b>DIMENSIONES DEL “SISTEMA DE AGITACIÓN”</b>	
<b>Escala</b> 1:100	Bach. Ivan NAPOLEÓN Condori Onofre	<b>Fecha:</b> 27/01/2000





<b>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO</b>		
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA		
<b>Nº 1</b>	<b>DISEÑO DE UN FERMENTADOR: “SISTEMA DE CALENTAMIENTO”</b>	
<b>Escala</b> 1:100	Bach. Ivan NAPOLEÓN Condori Onofre	<b>Fecha:</b> 27/01/2000