

CAPÍTULO II

BIORREACTORES

El biorreactor es el centro de todo proceso biotecnológico. El diseño y análisis del comportamiento de un biorreactor dependen del conocimiento de la cinética de las reacciones biológicas y de los balances de materia y energía. En la práctica, esta metodología se hace muy compleja debido a la naturaleza de la catálisis biológica y del caldo de fermentación, los cuales puede tener propiedades que varían con el tiempo y presentar patrones cinéticos y de flujo muy complejos. Además, los procesos de la transferencias de masa y calor añaden complejidad al problema.

En este capítulo, se realiza el análisis del comportamiento y diseño de un biorreactor considerando el modelo cinético de Monod y bajo la suposición de un comportamiento ideal de las fases líquida y gaseosa en el tanque. Se supone también que las células o enzimas en un biorreactor ideal están expuestas a un ambiente espacialmente uniforme de tal modo que la velocidad de reacción no varía localmente. Esta suposición es adecuada para describir el comportamiento de reactores a escala industrial aunque haya desviaciones en la mezcla ideal y distribución uniforme de las células o enzimas en el tanque. Es

Existen tres modos de operación de un biorreactor, caracterizados principalmente por la forma en que el sustrato es alimentado al tanque: modo discontinuo o batch, modo semicontinuo o fed-batch y modo continuo.

II.1.1 Modo discontinuo o batch: El crecimiento de microorganismos en batch se refiere a que las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial, sin que esta sea alterada por nutrientes adicionales o el lavado, por lo que el volumen permanece constante y sólo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, la velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador. El proceso finaliza cuando todo el sustrato es consumido por la biomasa. Esta forma de cultivo es simple y se utiliza extensamente tanto en el laboratorio como a escala industrial.

II.1.2 Modo semicontinuo o fed-batch: En un cultivo semicontinuo o fed-batch, los nutrientes son alimentados al biorreactor de forma continua o semicontinua, mientras que no hay efluente en el sistema. Según sea el objetivo de la operación, la adición intermitente del sustrato mejora la productividad de la fermentación manteniendo baja la concentración del sustrato. Un proceso de este tipo está restringido por la capacidad volumétrica del reactor.

II.1.3 Modo continuo: Un cultivo continuo consiste en alimentar nutrientes y retirar productos continuamente de un biorreactor. Bajo ciertas condiciones el cultivo puede alcanzar un estado estacionario, donde no existe variación con el tiempo del volumen del biorreactor. De esta manera se puede utilizar para producir sustancias biológicas a condiciones óptimas y para estudios fisiológicos. Los tipos de biorreactores para cultivo continuo son los de *Tipo Tanque Completamente Agitado (CSTR)* que comprenden al *quimiostato* y al *turbidostato* y el de *Tipo Tubo con Flujo Tapón (PFR)* de sus siglas en inglés).

II.2 Bioprocesos Típicos

II.2.1 Tratamiento anaeróbico de la materia orgánica

En la transformación anaeróbica (es decir, en ausencia del oxígeno) de la materia orgánica por los microorganismos en los ecosistemas naturales se produce biogás, compuesto por el bióxido de carbono y metano. El metano es el principal componente de los gases que se producen en los pantanos, en lagos y sedimentos marinos, plantaciones de arroz y en los tractos digestivos del hombre y los animales (rumiantes principalmente). Esta transformación se caracteriza por cuatro etapas metabólicas principales, dos para la acidogénesis y dos para la metanización. Se presentan cinco tipos de sustratos, cuatro tipos de biomazas y se obtiene un producto (metano). El diagrama de las cuatro etapas de la reacción es el siguiente:

1. $S_1 \rightarrow B_1 + S_2 + S_3 + S_4 + S_5$
2. $S_2 \rightarrow B_2 + S_5 + P_1$
3. $S_3 \rightarrow B_3 + S_2 + S_4 + S_5$
4. $S_4 + S_5 \rightarrow B_4 + P_1$

donde P_1 es el metano, S_1 es la glucosa, S_2 es acetato, S_3 es propionato, S_4 es hidrógeno y S_5 es dióxido de carbono, B_1 son las bacterias acidógenas, B_2 son las bacterias metanógenas-acetoclásticas, B_3 son las acetanógenas productoras obligadas de hidrógeno y B_4 las metanógenas-hidrogenófilas.

La digestión anaeróbica (o metanización) es un excelente proceso biológico para el tratamiento de la contaminación por hidrocarburos. Otro interés puede ser por su valor energético (recuperación y valorización del metano) y agronómico (producción de un abono de buena calidad). Mediante este proceso se obtienen generalmente mejores resultados que los obtenidos con el proceso aeróbico convencional. Dentro de sus aplicaciones se tiene: evaluación de

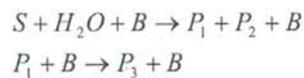
lodos en el tratamiento de la purificación del agua residual, procesos de reutilización de desechos urbanos o de los residuos industriales, entre otros.

II.2.2 Nitrificación en procesos de lodos activados

La nitrificación es el proceso de oxidación del amoníaco por organismos especializados llamados nitrificadores. Su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la de los organismos heterotróficos los cuales oxidan carbón orgánico y pueden ser lavados del reactor por medio del flujo de salida. En un sistema de lodos activados, cuando la carga orgánica es alta, se requieren altas velocidades de crecimiento de biomasa para que los microorganismos lleven a cabo la degradación de la materia. La nitrificación podría no ser posible bajo estas condiciones porque la concentración de nitrificadores sería muy baja.

II.2.3 La fermentación láctica

La fermentación de la leche como medio de conservación es conocida desde hace siglos. La leche recogida de las manadas, se coloca en un lugar caliente hasta su coagulación resultado, de la producción del ácido láctico por la microflora natural. Las primeras producciones de yogur datan desde 1919. La fermentación láctica es un proceso complicado, que implica el uso de varios productos y poblaciones bacterianas, cuyas evoluciones e interacciones aún no están bien caracterizadas. Durante la conversión de la leche en el yogur, la lactosa es la primera en transformarse en la glucosa y la galactosa, esto debido al ácido láctico y al crecimiento simbiótico de dos bacterias termófilas lácticas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaris*. La fermentación láctica se puede describir por medio de las ecuaciones de balance:



donde S representa la lactosa, B la biomasa, P_1 es la glucosa, P_2 es la galactosa y P_3 es el ácido láctico. Esta es una descripción general propuesta como un modelo simple de la fermentación láctica. Aquí el objetivo principal sería el de encontrar un proceso de control que nos permita optimizar la producción de biomasa y sus productos.

II.2.4 Crecimiento de levaduras

En el crecimiento de levaduras intervienen principalmente fermentaciones alcohólicas. Este tipo de reacción se caracteriza generalmente por tres etapas metabólicas, incluyendo cinco compuestos:

1. $S + C \rightarrow B + P$
2. $S \rightarrow B + E + P$
3. $E + C \rightarrow B + P$

donde S es la glucosa, C es el oxígeno disuelto, B es una levadura, P es el bióxido de carbono disuelto y E es el etanol. El principal objetivo en el crecimiento de levaduras será el de encontrar un proceso de control que optimice el rendimiento de productos de interés en el proceso.

II.3 Parámetros Cinéticos

Los parámetros cinéticos son importantes para la descripción de la evolución de la población microbiana, ya que del conocimiento del comportamiento de estos parámetros depende la modelación adecuada del sistema. Por ejemplo uno de los más importantes es la tasa específica de crecimiento o tasa de crecimiento μ , que se define como la velocidad de crecimiento de la biomasa (r_1) por unidad de concentración de biomasa ($x^{(1)}$):

$$\mu = \frac{r_1}{x^{(i)}}. \quad (\text{II.3.1})$$

La velocidad de crecimiento de la biomasa (r_1) a su vez, se define como la cantidad de biomasa formada por unidad de tiempo y por unidad de volumen de reacción. Del mismo modo, la velocidad de consumo del sustrato (r_2) es la cantidad de masa de sustrato consumido por unidad de tiempo y por unidad de volumen. Denotemos por τ el coeficiente de rendimiento en la conversión sustrato-biomasa el cual es definido como:

$$\tau = \frac{r_1}{r_2}. \quad (\text{II.3.2})$$

La caracterización matemática de los parámetros cinéticos es difícil porque depende generalmente de numerosas condiciones extracelulares físicas (temperatura, pH, homogeneidad del medio de cultivo,...) y químicas (concentración de sustrato en el reactor, naturaleza de las fuentes,...). Por ejemplo, el comportamiento del crecimiento microbiano y de la formación de producto esta influenciado por condiciones ambientales tales como la temperatura, pH y la concentración de oxígeno disuelto. A continuación describiremos los efectos de éstos parámetros.

II.3.1 Temperatura

La temperatura es un factor muy importante que afecta el funcionamiento de las células. De acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento, los organismos se clasifican en tres grupos: (1) psicrófilos (Temperatura óptima < 20°C), (2) mesófilos (20°C < Temperatura óptima < 50°C) y (3) termófilos (Temperatura óptima ≥ 50°C). La temperatura se va incrementando hasta llegar a la temperatura de crecimiento óptimo y la velocidad de crecimiento se

incrementa aproximadamente el doble por cada 10°C que aumenta la temperatura.

Por encima del rango de la temperatura óptima, la velocidad de crecimiento disminuye y puede ocurrir decaimiento o muerte celular. La temperatura afecta también la formación de producto. Por lo general, las temperaturas óptimas para el crecimiento microbiano y formación de producto son diferentes. La temperatura también afecta al coeficiente de rendimiento, como por ejemplo en la producción de proteínas simples.

Cuando la temperatura se incrementa por encima de la temperatura óptima, se incrementan también los requerimientos de mantenimiento celular. Esto se refiere a que las células gastan energía para mantener activa su membrana en el transporte de nutrientes y para sus funciones metabólicas esenciales tales como su motilidad y/o reparar daños en su estructura. Lo anterior significa que el coeficiente de mantenimiento se incrementa conforme la temperatura aumenta con una energía de activación de 15 a 20 *kcal/mol* provocando una disminución en el coeficiente de rendimiento [Ver Shuler y Kargi (1992), Bailey y Ollis (1977), Blanch y Clark (1996), entre otros].

II.3.2 pH

La concentración de iones hidrógeno (pH) afecta la actividad enzimática y la velocidad de crecimiento microbiano. El pH óptimo para el crecimiento puede ser diferente del requerido para la formación de producto. Generalmente, el rango de pH aceptable varía de ± 1 a 2 unidades de pH con referencia al óptimo. Cada organismo tiene su pH óptimo: el pH óptimo para las bacterias es 3 a 8; para las levaduras es de 3 a 6, para los mohos es de 3 a 7; para las células vegetales es de 5 a 6 y para las células animales es de 6.5 a 7.5.

Algunos organismos tienen mecanismos para mantener el pH intracelular constante en presencia de cambios ambientales. Cuando el pH no es el óptimo, los requerimientos de energía de mantenimiento aumentan. En las fermentaciones, el pH varía sustancialmente. A menudo la naturaleza de la fuente de nitrógeno es muy importante. Si la única fuente de nitrógeno es amonio, entonces, los iones hidrógeno son liberados en el medio como resultado de su utilización por los microorganismos provocando que el pH disminuya. Si la única fuente de nitrógeno es nitrato, entonces los iones hidrógeno son removidos del medio para reducir el nitrato a amonio lo que resulta en un incremento de pH.

El pH también puede cambiar debido a la producción de ácidos orgánicos, su utilización (en aminoácidos particularmente) o producción de bases. El suministro de CO₂ puede alterar fuertemente el pH en algunos sistemas, por ejemplo, en los cultivos de células animales. El pH se puede controlar por medio de buffers o un sistema de control de pH. La predicción teórica del pH óptimo en el crecimiento microbiano requiere del conocimiento de las características bioquímicas del organismo lo cual es muy difícil de conocer por lo que el valor del pH óptimo se determina experimentalmente [Ver Shuler y Kargi (1992), Bailey y Ollis (1977), Blanch y Clark (1996), entre otros].

II.3.3 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (DO) es un sustrato muy importante en las fermentaciones aeróbicas y puede ser un sustrato limitante debido a que el oxígeno es un gas soluble en el agua. En alta concentración celular, la tasa de consumo de oxígeno puede exceder a la tasa de suministro. Cuando el oxígeno es un factor limitante, la tasa específica de crecimiento varía con la concentración de oxígeno disuelto de acuerdo con la cinética de saturación; por debajo de la concentración crítica, el crecimiento o respiración se aproxima a una tasa de primer orden dependiente de la concentración de oxígeno disuelto.

La concentración crítica de oxígeno es de aproximadamente del 5% al 10% de la concentración de oxígeno disuelto saturado para bacterias y levaduras y de aproximadamente del 10% al 50% de la concentración de oxígeno disuelto saturado para cultivos de mohos, dependiendo del tamaño de los pellets de mohos. La concentración de oxígeno disuelto saturado en agua a $25^{\circ}C$ y 1 atm de presión es de cerca de 7 ppm . La presencia de sales y ácidos orgánicos disueltos pueden cambiar el valor de saturación mientras que a altas temperaturas el valor de saturación disminuye [Ver Shuler y Kargi (1992), Bailey y Ollis (1977), Blanch y Clark (1996), entre otros].

Como podemos ver, estos tres factores influyen considerablemente en la tasa de crecimiento, y tener una expresión matemática que la modele resulta difícil. Bajo estas circunstancias, la modelación de los procesos biotecnológicos se realiza considerando condiciones ambientales fijas de valores óptimos obtenidos experimentalmente, de tal forma que la elección de un modelo para la tasa de crecimiento debe justificarse empíricamente, además de que debe reflejar los efectos del sustrato, productos y biomasa sobre la cinética de crecimiento. Por lo tanto, la adecuación de un modelo es un problema de mucha importancia.

II.4 Modelos de Crecimiento

Durante mucho tiempo se han propuesto diferentes modelos para la tasa de crecimiento, el más antiguo es el de Verhults, que data de 1938 y expresa la velocidad de crecimiento como una función de la concentración de la biomasa:

$$\mu = \mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} \left(1 - \frac{x^{(i)}}{M} \right) \quad (\text{II.4.1})$$

donde $\mu_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}}$ es la velocidad máxima de crecimiento y M es una constante.

El modelo que más comúnmente se ha utilizado se basa en la Ley de Michaelis-Menten, introducida en 1913 para describir una reacción enzimática. En 1942, esta ley fue adoptada empíricamente por Monod bajo el supuesto que el crecimiento de la biomasa y el consumo de sustrato son proporcionales a la concentración de la biomasa, y se expresa matemáticamente como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{x^{(2)}}{K_s + x^{(2)}} \quad (II.4.2)$$

donde:

$x^{(2)}$ es la concentración de sustrato.

K_s es la constante de saturación.

En este trabajo usaremos la ley de Monod (Ec. II.4.2) como modelo. En Bastin y Dochain (1990) se pueden encontrar otros modelos para la tasa de crecimiento.

En investigaciones recientes, se considera a la velocidad de crecimiento como un parámetro variable en el tiempo cuya expresión analítica es desconocida. En este caso μ se estima por métodos adaptados [Ver, e.g., Hilgert (1997)].

II.5 Modelo del Biorreactor

En los reactores tipo tanque continuamente agitados, se asume que el proceso se lleva bajo la condición de mezclado perfecto, lo que implica que el medio es homogéneo. En la Figura 1 se muestra un biorreactor tipo tanque completamente agitado.

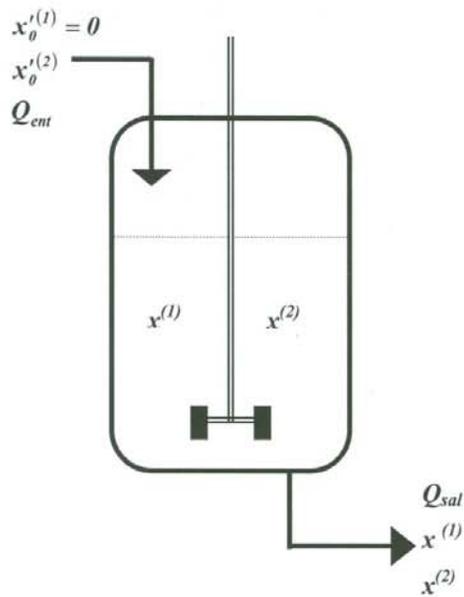


Figura 1. Biorreactor tipo tanque completamente agitado.

El comportamiento dinámico del crecimiento de una población de microorganismos en un medio con un solo sustrato limitante lo podemos expresar mediante un balance de masa de la siguiente manera:

La acumulación neta de biomasa con entrada estéril ($x_0^{(1)} = 0$) en el biorreactor es:

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 V - Q_{sal} x^{(1)} ; \quad (II.5.1)$$

donde:

V es el volumen del tanque [l].

$x^{(1)}$ es la concentración de biomasa [mg/l].

$r^{(1)}$ es la velocidad de crecimiento de la biomasa [mg/l-h].

Q_{sal} es el caudal o flujo de salida [l/h].

La acumulación neta de sustrato en el biorreactor está dada por:

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2 V + Q_{ent} x_0^{(2)} - Q_{sal} x^{(2)} ; \quad (II.5.2)$$

donde:

$x^{(2)}$ es la concentración de sustrato o nutriente [mg/l].

r_2 es la velocidad de consumo de sustrato [mg/l-h].

Q_{ent} es el caudal o flujo de entrada [l/h].

$x_0^{(2)}$ es la concentración de sustrato en el efluente [mg/l].

Por último, la variación del volumen es

$$\frac{dV}{dt} = Q_{ent} - Q_{sal} , \quad (II.5.3)$$

El modelo descrito por las Ecs. (II.5.1)-(II.5.3) se adapta a los 3 tipos de biorreactores descritos anteriormente. A continuación veremos sus características específicas.

II.5.1 El biorreactor batch

Como se mencionó anteriormente, un biorreactor batch es un biorreactor en el que no existe flujo de entrada ni flujo de salida, es decir:

$$Q_{ent} = Q_{sal} = 0 ,$$

por lo que las Ecs. (II.5.1)-(II.5.3) quedan entonces

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 V,$$

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2 V,$$

$$\frac{dV}{dt} = 0.$$

El tanque está inicialmente lleno con una gran cantidad de sustrato y una pequeña cantidad de biomasa (inóculo). Durante el proceso de fermentación no se incorpora sustrato y este se detiene cuando ha sido consumido casi en su totalidad, después se extrae la biomasa y los productos (si los hay). El volumen de cultivo se mantiene constante.

II.5.2 El biorreactor fed-batch

Un biorreactor fed-batch es un biorreactor en el cual no hay flujo de salida, es decir,

$$Q_{sal} = 0,$$

y entonces las Ecs. (II.5.1)-(II.5.3) quedan:

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 V,$$

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2 V x^{(1)} + Q_{ent} x_0^{(2)},$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{ent}.$$

El tanque contiene inicialmente una pequeña cantidad de sustrato y biomasa y durante el proceso se está incorporando sustrato.

II.5.3 Biorreactor tipo tanque completamente agitado (CSTR)

En un cultivo continuo de microorganismos, el biorreactor esta siendo continuamente alimentado por sustrato, el flujo de salida es igual al flujo de entrada y el volumen del cultivo se mantiene constante:

$$Q_{ent} = Q_{sal} = Q,$$

En este caso, las Ecs. (II.5.1)-(II.5.3) quedan:

$$\begin{aligned} \frac{d(Vx^{(1)})}{dt} &= r_1 V - Qx^{(1)}, \\ \frac{d(Vx^{(2)})}{dt} &= -r_2 V + Qx_0^{(2)} - Qx^{(2)}, \\ \frac{dV}{dt} &= 0. \end{aligned} \tag{II.5.4}$$

En este trabajo consideraremos el modelo descrito por la Ec. (II.5.4), el cual, retomando las Ecs. (II.3.1) y (II.3.2), es equivalente a:

$$\begin{aligned} \frac{dx^{(1)}}{dt} &= \left(\mu - \frac{Q}{V} \right) x^{(1)}, \\ \frac{dx^{(2)}}{dt} &= -\frac{\mu x^{(1)}}{\tau} + \frac{Q}{V} (x_0^{(2)} - x^{(2)}), \\ \frac{dV}{dt} &= 0, \end{aligned} \tag{II.5.5}$$

donde μ es dado por la Ec. (II.4.2).