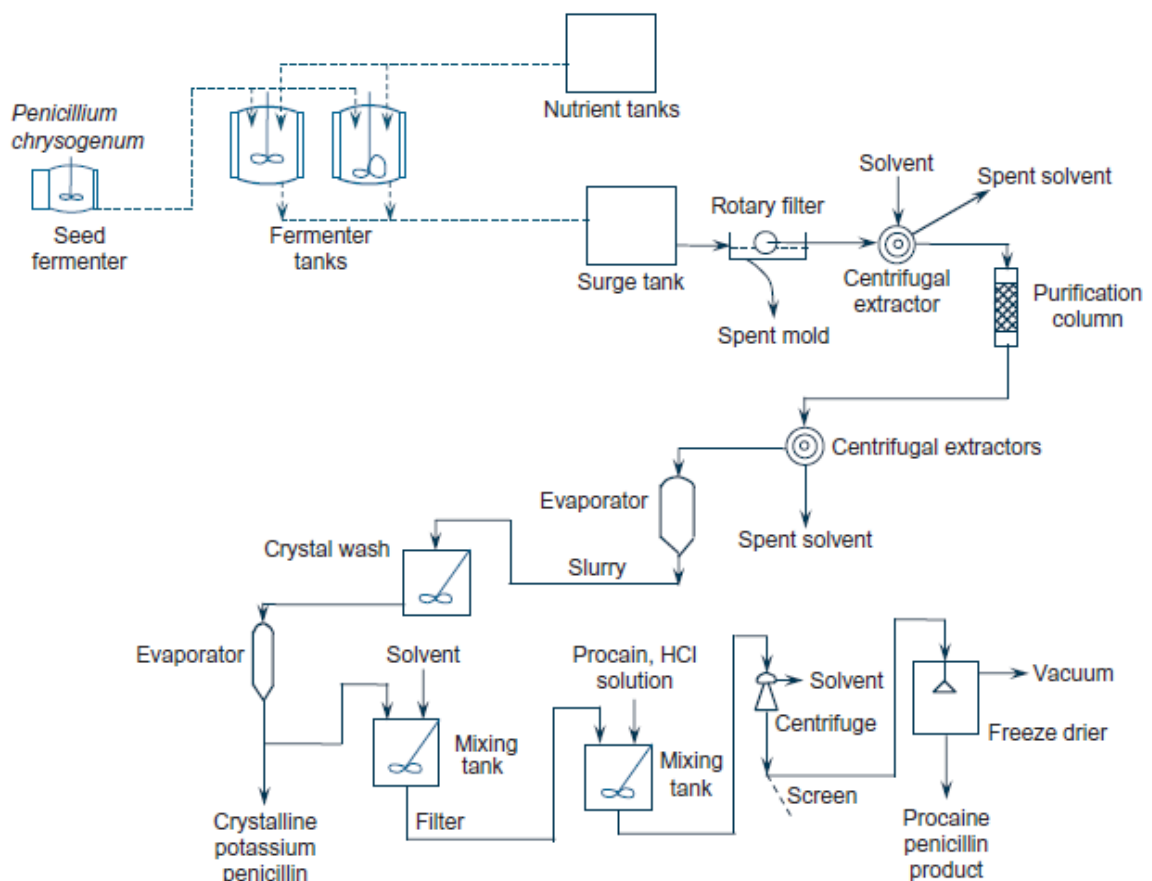


(Actualizada
2018)

Introducción a los Bioprocesos



R. Roberto Gonzalez-Castellanos

Profesor

(Actualizada 2018)

Módulo IV: Principios de Ingeniería de los Bioprocesos

Unidad III: Introducción a los Bioprocesos

Profesor: Dr. Roberto A. González

Fecha: 15/02/2014

Actividad: Conferencia

Tiempo: 8 horas

Tema I: Introducción General a los Bioprocesos

Índice de contenidos

Presentación.....	1
Contenido.....	2
Objetivos generales.....	4
Introducción.....	4
Orientaciones metodológicas para el aprendizaje.....	4
Desarrollo.....	5
Bibliografía consultada.....	49
Autoevaluación.....	49

Contenido

Introducción General a los Bioprocesos.....	5
1 Aspectos generales de los Bioprocesos.....	5
2 Etapa de Tratamiento Previo (Pre Tratamiento).....	7
1. Operaciones Físicas de Procesamiento.....	7
2. Esterilización.....	10
Introducción.....	10
Tipos de Esterilización.....	12
ESTERILIZACIÓN POR CALOR.....	12
Esterilización Discontinua.....	12
Esterilización Continua.....	14
ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN.....	14
OTROS PROCESOS DE ESTERILIZACION.....	16
3. Preparación y propagación de inóculos.....	16
Preservación del inóculo.....	16
Crecimiento del inóculo.....	17
4. Formulación de Medios.....	18
Introducción.....	18
Fuentes de carbono.....	19

Fuentes de nitrógeno	20
5. Hidrólisis.....	21
3 Etapa de Biorreacción.....	22
Introducción	22
Tipos de Biorreactores	23
Modos de Operación de los Biorreactores.....	25
4. Procesos de Tratamiento de Productos (Downstream)	29
Introducción	29
Etapas de los Procesos de Tratamiento de los Productos	30
Algunas operaciones unitarias que se usan con frecuencia en la Separación de Productos.....	32
Filtración.....	32
Centrifugación.....	32
Ruptura celular.....	33
Extracción líquida de dos fases acuosas	34
Cromatografía	35
Destilación.....	35
Evaporación.....	35
Cristalización	36
Secado	36
5. Principios básicos de Escalado de Procesos Biotecnológicos	37
Problemas que surgen relacionados con el cambio de escala	37
Etapas a considerar en los trabajos de Investigación y Desarrollo (I+D).....	38
Criterios a considerar para los límites entre escalas.....	41
Escala de laboratorio.....	42
Escala de banco	43
Escala piloto	44
Escala industrial.....	45

Objetivos Generales

Brindar al estudiante la definición de los Procesos Biotecnológicos (Bioprocesos), las etapas que los componen y la importancia de los mismos en la Industria Biotecnológica, así como introducir los principios básicos del escalamiento de los procesos biotecnológicos.

Introducción

Los Procesos Biotecnológicos, conocidos como Bioprocesos, han acompañado el desarrollo humano desde los albores de la civilización y en la actualidad están ganando cada vez más atención debido a su enorme potencial para la obtención de valiosos productos, especialmente para el cuidado de la salud humana y a causa de su inherente atributo como procesos sostenibles. Nuevas bio-industrias tienen gran potencial por ser procesos eficientes basados en recursos renovables y caracterizados por una mínima contaminación ambiental. Por ejemplo, los modernos métodos de optimización de enzimas e ingeniería metabólica son poderosas herramientas para el desarrollo de novedosos y eficientes biocatalizadores. El desarrollo de nuevos procesos se refuerza con la aplicación de las modernas técnicas de simulación y modelación, combinados con métodos de evaluación que se aplican sistemáticamente en las primeras etapas del proceso de desarrollo.

La futura sostenibilidad esencialmente depende de la habilidad de la industria para desarrollar nuevos procesos que sean (i) exitosos comercialmente a corto y largo plazo, (ii) amigables con el ambiente, que emplean el mínimo de recursos, preferentemente renovables, que significan una muy pequeña carga para el medio ambiente y (iii) satisfacen las necesidades de la sociedad.

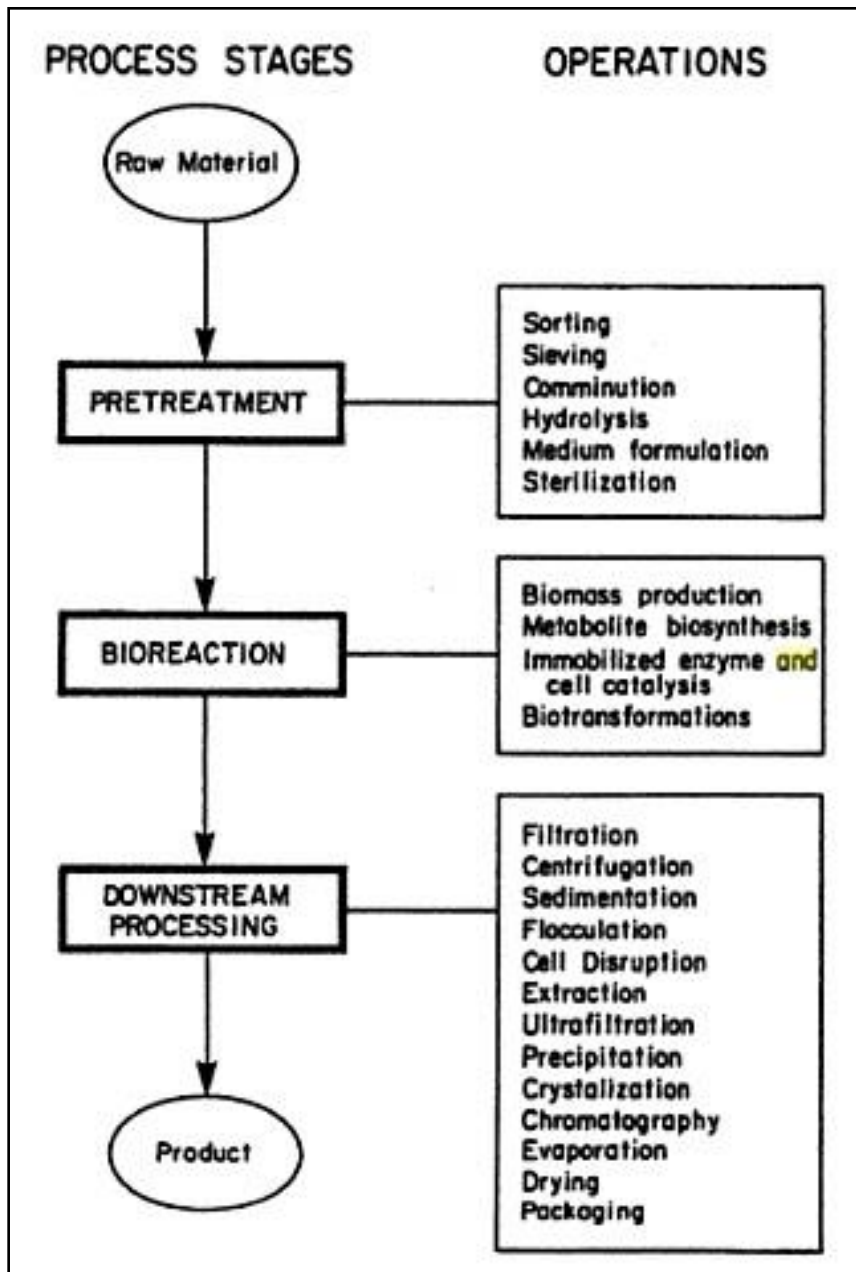
Orientaciones metodológicas para el aprendizaje

Para esta temática resulta decisivo que el estudiante recuerde los conceptos de operaciones unitarias y los procedimientos de balances de materiales y energía aprendidos en los temas anteriores de este Módulo, que son la base del presente tema y que realice una lectura minuciosa de los materiales que se le suministran y de las diferentes fuentes bibliográficas. Una vez hecha esta lectura, debe realizar un resumen de los aspectos que le parecen de mayor grado de dificultad y aclarar las dudas que tenga por medio de la consulta al docente. Debe tener en cuenta que el material presentado en esta guía, es solo un breve resumen de la enorme cantidad de información que se encuentra disponible en la literatura científica, tanto en libros como, sobre todo, en artículos de revistas científicas. Por lo tanto, es muy importante que se continúe profundizando en estos temas, mediante la revisión de la literatura disponible, buscando nuevos conocimientos y aplicaciones que contribuyen a la solución de las necesidades de nuestra sociedad, los que le permitirá ser cada vez mejores profesionales.

Introducción General a los Bioprocesos

1 Aspectos generales de los Bioprocesos

Cualquier operación a gran escala que involucre la transformación en un producto, de cualquier materia prima, biológica o no biológica, mediante la acción de microorganismos, cultivos de células



animales o vegetales o por materiales derivados de los mismos como las enzimas y los organelos, se denominan **Procesos Biotecnológicos** o de manera abreviada **Bioprocesos**. El **producto** puede ser comercializable, como la insulina, penicilina, proteína unicelular o enzimas, o puede tener poco valor comercial como en los procesos de tratamientos de residuales. En todos los casos, en los **bioprocesos** se parte de la materia prima para obtener producto y se consideran tres etapas para el desarrollo del **bioproceso** (Figura 1) [1][2].

La materia prima o alimento se debe convertir en formas que sean susceptibles de ser sometidas al procesamiento, lo que se lleva a cabo en la primera etapa, la **Etapa de Tratamiento Previo**. En esa etapa (Figura 1) están involucradas una o más de las siguientes operaciones: Selección, tamizado, reducción de tamaño, hidrólisis, formulación de medios y esterilización. A continuación, se lleva a cabo la segunda etapa, la

Figura 1 Etapa de los bioprocesos

Etapa de Biorreacción, que es el corazón del **bioproceso**. En esa etapa la transformación puede involucrar la transformación de sustrato en biomasa o en biomasa y algún producto bioquímico o enzima. Alternativamente la conversión puede utilizar células completas o enzimas (inmovilizadas o en suspensión) como biocatalizadores.

Generalmente el material producido tiene que ser procesado en la denominada **Etapa de Tratamiento de los Productos (Downstream)**, para ser convertida en formas útiles. Los **Procesos de Tratamiento** consisten en operaciones predominantemente físicas, mediante las cuales se obtiene la concentración y purificación de los productos. Las operaciones de tratamiento más comunes son: *Filtración, centrifugación, Sedimentación, floculación, ruptura celular, extracción, ultrafiltración, precipitación, cristalización, cromatografía, evaporación, secado y empaque*. Los productos purificados pueden tener diferentes formas físicas (líquidos, lodos, polvos, cristales) para diferentes aplicaciones.

El diseño de los Bioprocesos requiere considerar con mucho cuidado las propiedades físicas y químicas de los materiales que se procesarán y delimitar las tensiones máximas a que serán sometidas (temperatura, pH, esfuerzo cortante, contaminación, presión, exposición a químicos desnaturalizadores), de manera que puedan ser tolerados de forma segura. Típicamente los bioprocesos operan dentro del denominado rango fisiológico (pH ~ 7, temperatura $\leq 37^{\circ}\text{C}$). Pero las condiciones específicas dependen mucho del proceso que se esté desarrollando y en ocasiones no se puede evitar que el material se exponga a condiciones de temperatura y pH relativamente severas y en esos casos hay que minimizar la duración de esas exposiciones y tomar precauciones adicionales (e. g. descender la temperatura, añadir productos químicos que eviten la oxidación, etc.), para reducir el impacto de esa exposición. En el caso de la presión, los microorganismos no se afectan por las presiones que se encuentran normalmente en los biorreactores (≤ 2 MPa), pero para presiones más elevadas puede ser importante el efecto de toxicidad asociado al CO_2 , debido al incremento de la solubilidad del CO_2 con el aumento de la presión.

Los gradientes de velocidad dentro de los fluidos o cerca de las superficies en movimiento (e.g., agitadores, partículas de líquido o burbujas de gas), tienen la potencialidad de dañar los frágiles biocatalizadores. Las bacterias y levaduras, que crecen como células individuales, son más tolerantes al esfuerzo cortante. Las especies modificadas por ingeniería genética, mutantes sin paredes y protoplastos, son frecuentemente susceptibles de daño por esfuerzo cortante, debido a la debilidad o ausencia de sus paredes celulares. Las bacterias filamentosas y los hongos con micelios tienen mayores dimensiones de partículas y muestran signos de daño mecánico cuando se encuentran en campos con alto esfuerzo. También las células animales y de plantas son muy sensibles al esfuerzo. Sin embargo, las enzimas, con la excepción de los complejos multi-enzimáticos y las enzimas asociadas a membranas, no se afectan por el esfuerzo cortante en ausencia de interface gas-líquido. Muchos fluidos biológicos, como algunos caldos de fermentación y la sangre, muestran un comportamiento de flujo dependiente del esfuerzo, aunque resulta difícil cuantificar los campos de esfuerzo cortante en los equipos de bioprocesos.

2 Etapa de Tratamiento Previo (Pre Tratamiento)

La materia prima disponible debe alcanzar las condiciones requeridas para que se puedan realizar las biorreacciones, para lo cual se utilizan diferentes **operaciones físicas de procesamiento** de uso común en la industria, como las operaciones de selección, tamizado y reducción de tamaño. Cuando ya se dispone de la materia prima con la pureza y el estado físico adecuado para el bioproceso, se llevan a cabo entonces las etapas de tratamiento previo específicas de los bioprocesos, como **esterilización, hidrólisis y formulación de medios**.

1. Operaciones Físicas de Procesamiento

La gran diversidad de materias primas a utilizar en los bioprocesos y las diferentes características de las mismas hacen muy variadas las necesidades de tratamiento previo iniciales, las que además son comunes a toda la industria y por lo tanto en este epígrafe se ejemplificará con un proceso biotecnológico de tratamiento de residuales: la Digestión Anaerobia de la Fracción Biodegradable de los Residuos Sólidos Urbanos [3].

El proceso de Digestión Anaerobia en general permite un aprovechamiento integral de los residuos orgánicos con producción de energía renovable (Figura 2) que disminuye la emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEI) y evita la contaminación ambiental del agua y de los suelos [3].

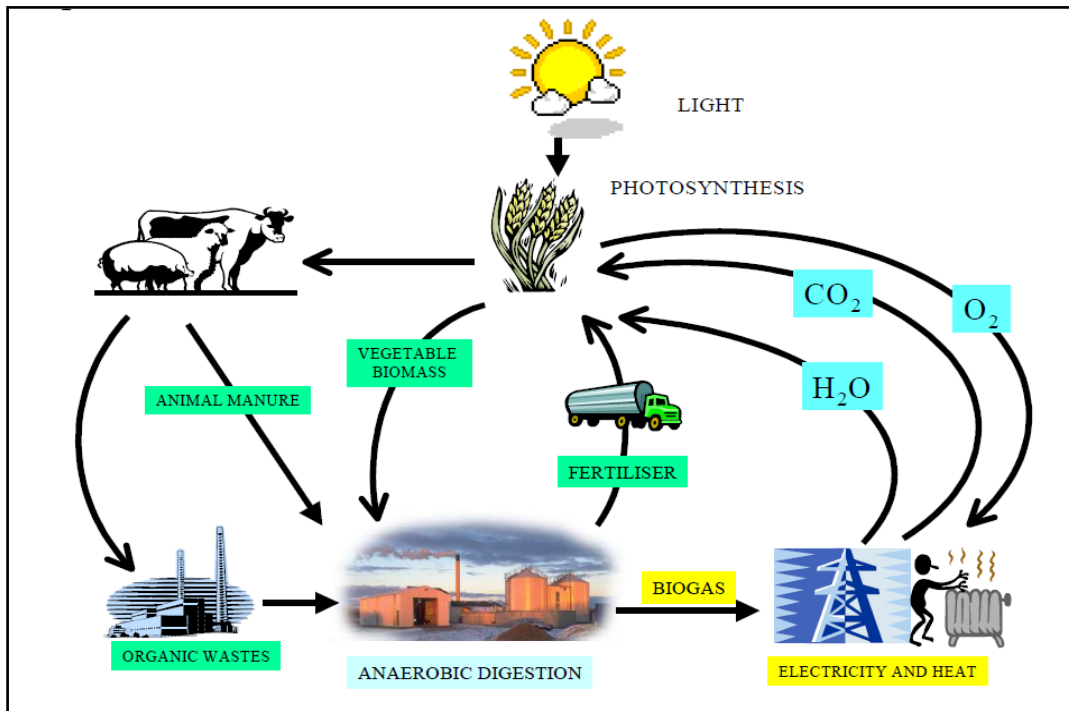


Figura 2 Ciclo integral de la Digestión Anaerobia de los Residuos Orgánicos

En el caso particular de los Residuos Sólidos Urbanos, estos constituyen uno de los grandes problemas ambientales en las ciudades de todo el mundo y para su tratamiento adecuado se requiere de la participación de la ciudadanía y de la aplicación de un sistema de *Gestión*

Integral de los Residuos (GIS) que asegure la separación en la viviendas de la fracción biodegradable del resto de los componentes de los RSU, mediante un programa de separación de los residuos domiciliarios (Figura 3). De esa forma se asegura el trabajo más eficiente de las plantas que procesarán la fracción biodegradable y además se facilita el reciclaje de los distintos componentes no biodegradables (metales, vidrio, papel, cartón, plástico). Pero incluso con la aplicación de la separación en la fuente, siempre en la corriente de alimentación a una planta de Digestión Anaerobia se encontrarán componentes no biodegradables que se deben separar antes de alimentar los digestores.



Figura 3 Separación en el origen de los Residuos Sólidos Urbanos en orgánicos (biodegradables) y los que no lo son.

La fracción biodegradable de los RSU que llega a una planta de procesamiento, tiene que pasar por un proceso de clasificación, que elimine las sustancias indeseables y que las clasifique para su recuperación posterior, un proceso de separación por tamaños, que permita

seleccionar el rango de tamaño de partícula adecuado para la digestión anaerobio y el posterior mezclado con agua para llegar al contenido óptimo de sólidos totales (~10%) para los procesos por vía húmeda (Figura 4).

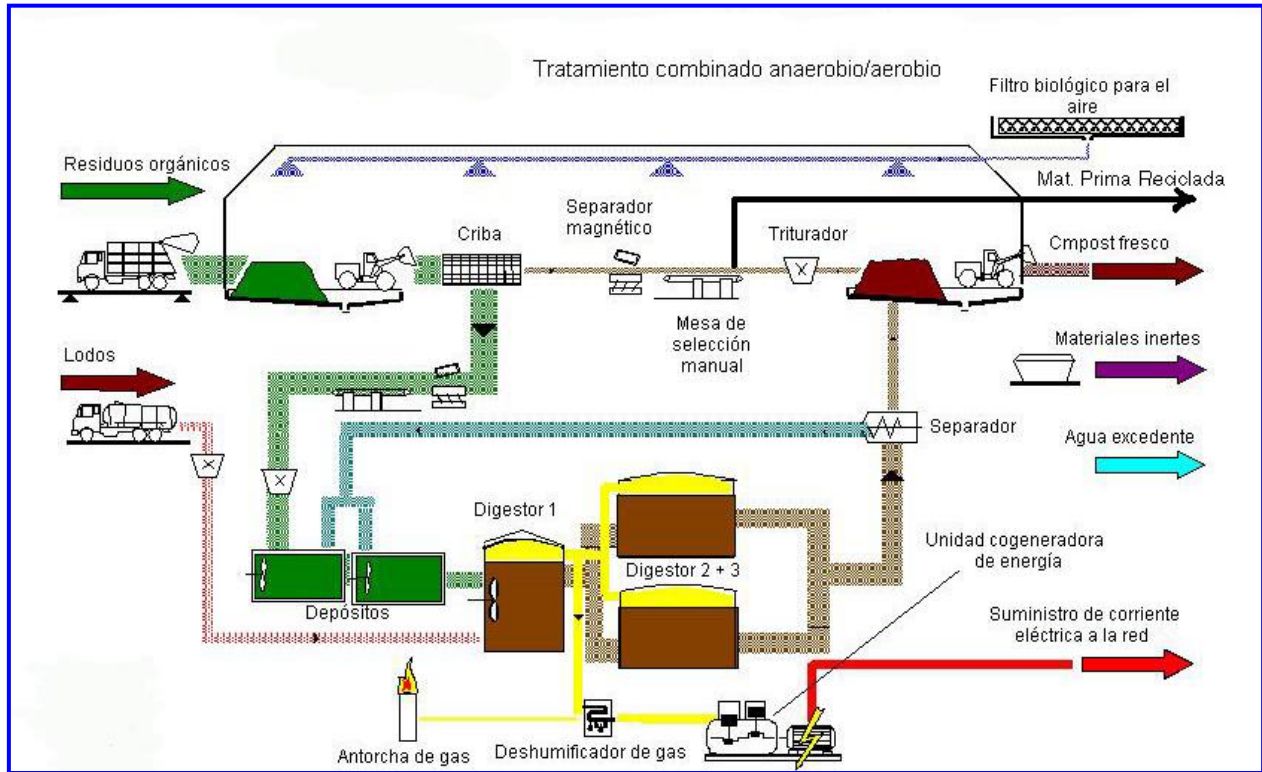


Figura 4 Producción de biogás a partir de residuos sólidos, incluyendo la preparación de los digestores.

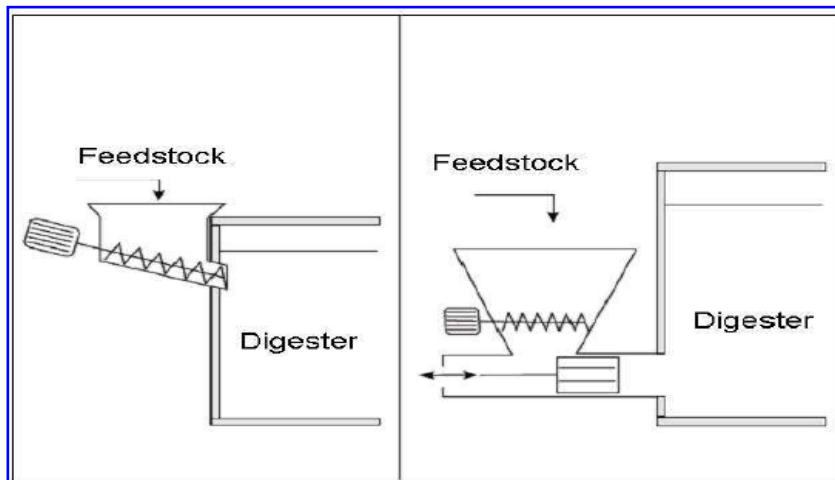


Figura 5 Sistemas de alimentación de sólidos con tornillo sin fin

En ocasiones la planta se alimenta también con otras sustancias sólidas, para las cuales se utilizan sistemas de dosificación de sólidos generalmente del tipo de tornillo sin fin [3] (Figura 5) y el mezclado de las sustancias sólidas con el agua generalmente se hace mediante bombas de tornillo (Figura 6).

2. Esterilización

Introducción

Con la excepción de los tratamientos biológicos de residuos, como el ejemplo anterior de la digestión anaerobia de residuos orgánicos sólidos, la mayoría de los bioprocesos productivos requieren el cultivo de microorganismos o células eucariotas y por lo tanto dependen del mantenimiento en el cultivo de la especie única con la cual se inocula el biorreactor. La contaminación con otros microorganismos y virus se previene mediante la **esterilización** de la alimentación de líquidos y gases que se van a adicionar al proceso, ingeniería estéril de las plantas en las que se realizan los bioprocesos y aplicación de técnicas estériles para los bioprocesos.

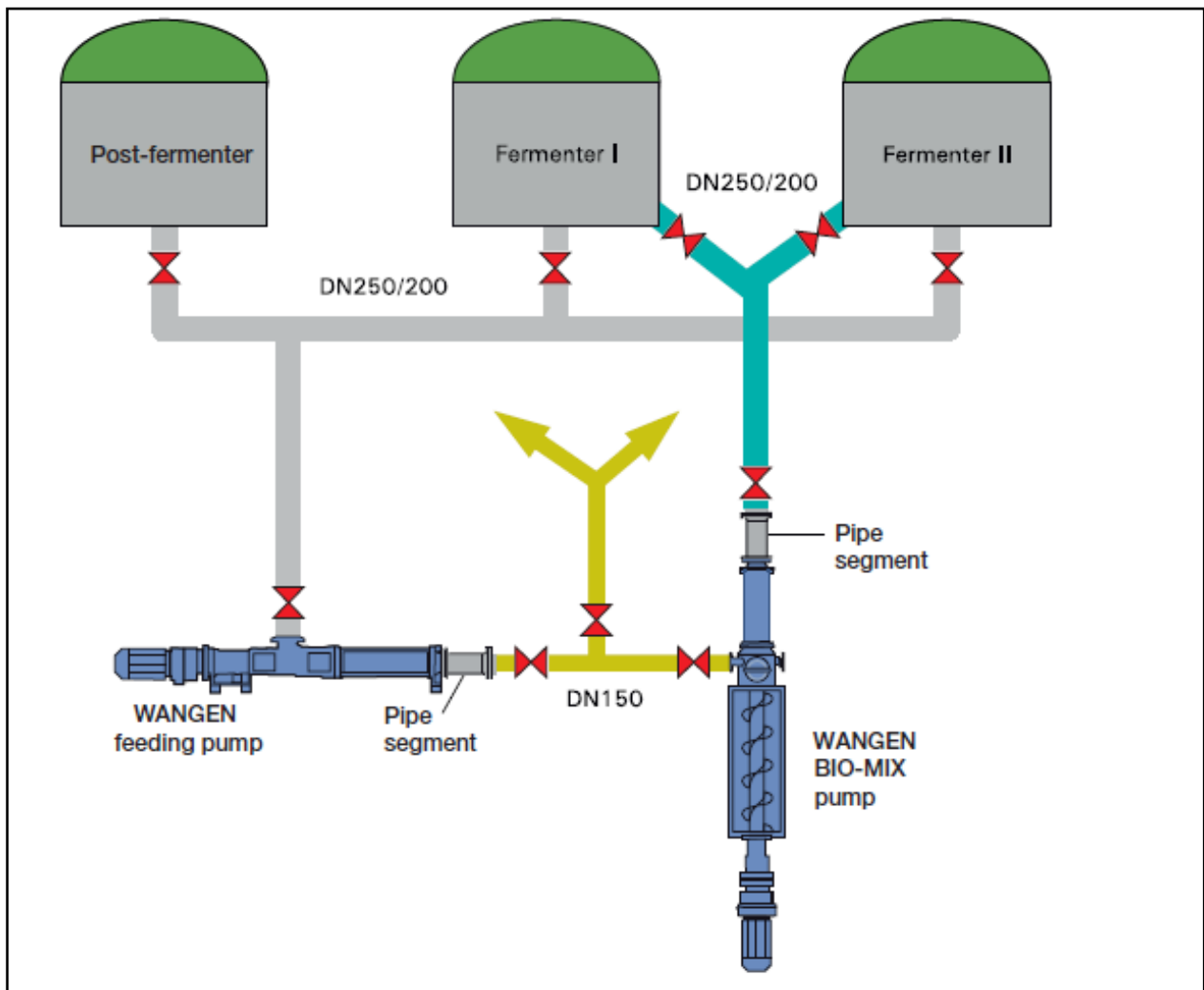


Figura 6 Alimentación y mezclado con bombas de tornillo

Antes de entrar en detalles sobre los procesos de esterilización es importante dejar definida la relación entre los conceptos de **asepsia** y **esterilidad**. La **esterilidad**, o sea el ambiente estéril, se logra cuando se han eliminado todos los organismos viables y resulta

imprescindible para los medios de cultivo, ya que no puede haber nada ningún otro organismo que el que se va a inocular posteriormente, de manera que no haya competencia. Con posteridad a la inoculación hay que mantener la **asepsia**, o sea hay que lograr que sólo se desarrolle el microorganismo deseado, o sea que se mantenga un cultivo axénico, lo que resulta imprescindible para que se pueda desarrollar con éxito el proceso productivo.

Además, existen dos conceptos relacionados: **desinfección** y **pasterización**. La **desinfección** es la remoción o destrucción por cualquier vía de organismos vivos que puedan causar daño particular o infección. No se requiere destruir todos los microorganismos existentes, como en el caso de la **esterilización**, sino solamente los que pueden producir un resultado no deseado. En el caso de la **pasterización**, solamente se destruyen algunos de los microorganismos presentes en materiales sensibles al calor como la leche y la cerveza. El proceso consiste en calentar el fluido en cuestión a ≈ 62 °C, mantenerlo a esa temperatura durante 30 minutos y después enfriarlo lo más rápido posible. Precisamente este proceso se denomina **pasterización** en honor a Pasteur, ya que fue a partir de sus trabajos que se conoció la existencia de los distintos tipos de microorganismos y se establecieron nuevos conceptos que resultaron decisivos para el desarrollo de la Industria Biotecnológica.

Los métodos de esterilización más importantes son la **esterilización por calor** y la **esterilización por filtración**, aunque existen otros métodos, como el empleo de la radiación ultravioleta. El uso del calor se basa en que éste desnaturaliza las enzimas de los microorganismos, aunque afecta también a las vitaminas del medio. Es necesario mantener la temperatura de esterilización un tiempo suficiente para asegurar la destrucción de todos los microorganismos y en especial de las esporas bacterianas, que son muy resistentes.

Sin embargo las temperaturas necesarias para causar la muerte efectiva de los microbios también causan reacciones adversas que destruyen muchos constituyentes termolábiles de los medios de cultivo como las vitaminas y los factores de crecimiento. También pueden ocurrir reacciones entre los componentes del medio, como por ejemplo la **Reacción de Maillard** entre los carbohidratos y las proteínas, cuyos productos afectan adversamente el desarrollo microbiano y por lo tanto reducen el rendimiento de la biorreacción. Por lo tanto, el éxito de las biorreacciones industriales depende de obtener un balance económico entre una insuficiente esterilización, lo que provoca pérdidas en las plantas asociadas a las frecuentes contaminaciones y una reducción de rendimiento producida por un sobre calentamiento.

La tasa de desnaturalización térmica (k_d) de las esporas microbianas contaminantes es función de la temperatura, lo que se expresa con la ecuación siguiente:

$$k_d = A e^{-\Delta E/RT} \quad (1),$$

donde ΔE es la energía de activación para un microorganismo particular, A es el parámetro de Arrhenius y T la temperatura absoluta. Las esporas del **Bacillus stearothermophilus** y del **Clostridium botulinum** están entre las más resistentes al calor y por lo tanto los procesos de esterilización se diseñan teniendo en cuenta que sean efectivos contra ellas. La energía

de activación (ΔE) para la destrucción de esas esporas es de $2.5 - 2.9 \times 10^8 \text{ J.kmol}^{-1}$ y el valor de A es de $\sim 1.6 \times 10^{36} \text{ s}^{-1}$. De manera similar, la desnaturalización de los nutrientes también depende de la temperatura:

$$k_n = A_n e^{-\Delta E_n/RT} \quad (2)$$

De las ecuaciones (1) y (2) se obtiene que:

$$\frac{k_d}{k_n} = \frac{A}{A_n} e^{(\Delta E_n - \Delta E)/RT} \quad (3)$$

La energía de activación (ΔE) de la mayoría de los nutrientes es mucho más baja que la ΔE para la destrucción microbiana. Por ejemplo, ΔE para el hidrócloruro de tiamina (vitamina B6) es sólo de $9.2 \times 10^7 \text{ J.kmol}^{-1}$. Por lo tanto, de ese simple análisis de cinética de desnaturalización se obtiene que la esterilización a alta temperatura por un corto periodo de tiempo es preferible para maximizar la destrucción microbiana y reducir la pérdida de nutriente (ecuación 3), por lo tanto operar a alta temperatura producirá una mayor relación k_d/d_n [2] y esa es la base del proceso de esterilización de **Alta Temperatura Corto Tiempo (HTST)** por sus siglas en inglés) que es el más utilizado en la actualidad en la industria de los bioprocesos.

Tipos de Esterilización

ESTERILIZACIÓN POR CALOR

La Esterilización por Calor se puede hacer de manera continua o discontinua:

Esterilización Discontinua

En la esterilización discontinua se utiliza el vapor como medio de calentamiento para lograr la eliminación de los organismos vivos. En ese proceso hay que considerar las etapas de calentamiento y enfriamiento y las pérdidas de calor y es un proceso relativamente lento. Se comienza por evacuar el aire que hay dentro del equipo, para lo cual se emplean chorros de vapor a presión. El proceso se lleva a cabo en recipientes enchaquetados a los que se le suministra vapor en la chaqueta durante un periodo de tiempo determinado.

Las autoclaves se utilizan principalmente para esterilizar utensilios y equipos que se utilizan en los bioprocesos, incluyendo los biodigestores de pequeño tamaño (que por esa causa se denominan "autoclaveables") y en menor medida para la esterilización de los medios de cultivo ya que tienden a sobrecalentar los medios. Además, estos equipos no cuentan con sistemas de recuperación de energía y por lo tanto no resultan económicos para su implementación a gran escala. Sin embargo, es de uso común en las escalas de laboratorio y banco.

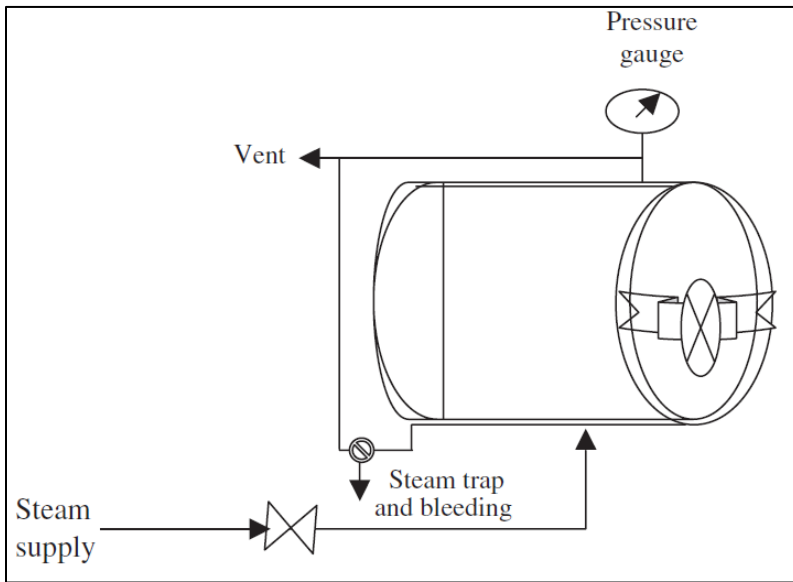


Figura 7 Esterilización con presión de vapor (autoclave)

El proceso de esterilización en estos equipos comienza cuando la chaqueta se ha llenado con vapor y se alcanza la presión de 105 kPa (15 psig) y a partir de ese momento es que se cuenta la duración de la esterilización. Usualmente el proceso dura entre 15 y 30 minutos, en dependencia del tipo y volumen del medio de cultivo a esterilizar. , la que normalmente (normalmente entre 15 y 30 minutos). Por ejemplo, la esterilización de un litro de medio a 121° C requiere 20 minutos. Volúmenes mayores de medio requieren de mucho más tiempo. Se

recomienda utilizar tiempos de retención de 20, 10 y 3 minutos para temperaturas de 121, 126 y 134° C respectivamente.

La figura 8 muestra una curva típica para la esterilización discontinua de un medio en un fermentador [4]. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporas es 100 °C. Por lo tanto, tendremos eliminación de esporas de 100 a 120 °C durante la etapa de calentamiento y de 120 a 100 °C durante la correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo. En fermentadores industriales de 60,000 litros, por ejemplo, esos tiempos están en el orden de 28 a 30 minutos y de 11 a 14 minutos para los períodos de calentamiento y enfriamiento respectivamente.

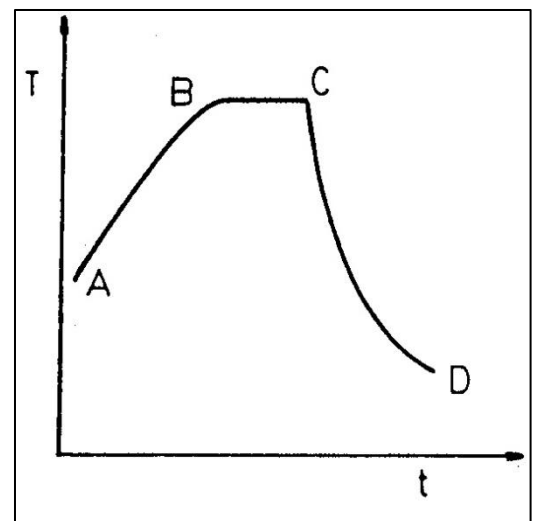


Figura 8 Variación de la temperatura en función del tiempo en la esterilización discontinua

Teniendo en cuenta la necesidad de preservar el medio de cultivo, resulta conveniente realizar la esterilización a la mayor temperatura posible y con el menor tiempo de duración. Para cumplir

con esos objetivos se recomienda un tiempo de retención de tres minutos a una temperatura de 134° C.

Esterilización Continua

Uno de los métodos utilizados para la esterilización continua es la inyección directa de vapor vivo en el medio, con lo que se elimina el intercambio de calor a través de la chaqueta. El medio se mantiene en el circuito de esterilización por un tiempo determinado de manera de asegurar el tiempo de retención necesario para asegurar la esterilización. El proceso se completa con una cámara de vacío para la expansión del vapor, lo que permite separar parte del agua que se le añade al medio (Figura 9, izquierda). Este método tiene el inconveniente de que se produce una dilución del medio, pero tiene la ventaja de que tiene mejor economía del calor, mediante la utilización de pre-calentadores o economizadores de calor. Por ejemplo, en lugar de utilizar una corriente fría de agua para enfriar el medio, el medio ya esterilizado intercambia su calor con el que va a ser esterilizado, con lo que se ahorra vapor y por lo tanto se reduce la dilución del medio.

Para realizar el intercambio de calor se utilizan preferentemente intercambiadores del tipo de platos calientes a contracorriente, ya que ese tipo de intercambiadores son muy eficientes y fáciles de mantener y eso es muy importante porque en este proceso el ensuciamiento de los intercambiadores es un serio problema, ya que las proteínas se depositan en las superficies calientes de los intercambiadores, causando disminución del coeficiente global de transferencia de calor.

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

Para los medios líquidos que sean muy susceptibles al calor se puede utilizar el proceso de Esterilización por Filtración, siempre y cuando no tengan muchas suciedades que puedan tupidir los poros de los filtros. En ese caso se utiliza dos etapas de filtrado, una etapa inicial para eliminar impurezas, con filtros que tengan un tamaño de poros de 0.45 μm y terminar con filtros que tengan un tamaño de poros de 0.22 μm (en algunos casos 0.1 μm), con los cuales se asegura la esterilización del medio. Este proceso se utiliza también para la esterilización del aire en los procesos aerobios [4] (Figura 10).

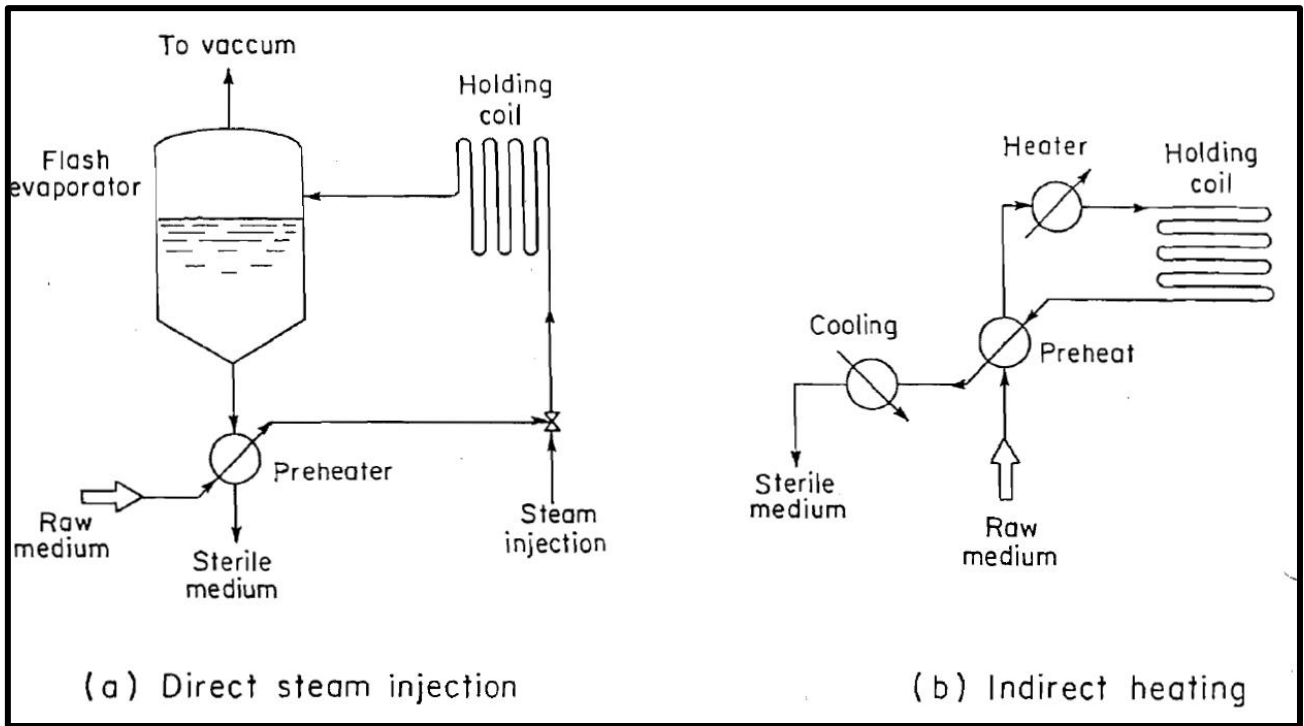


Figura 9 Proceso de esterilización continua con inyección de vapor directo (izquierda) y por calentamiento indirecto (derecha)

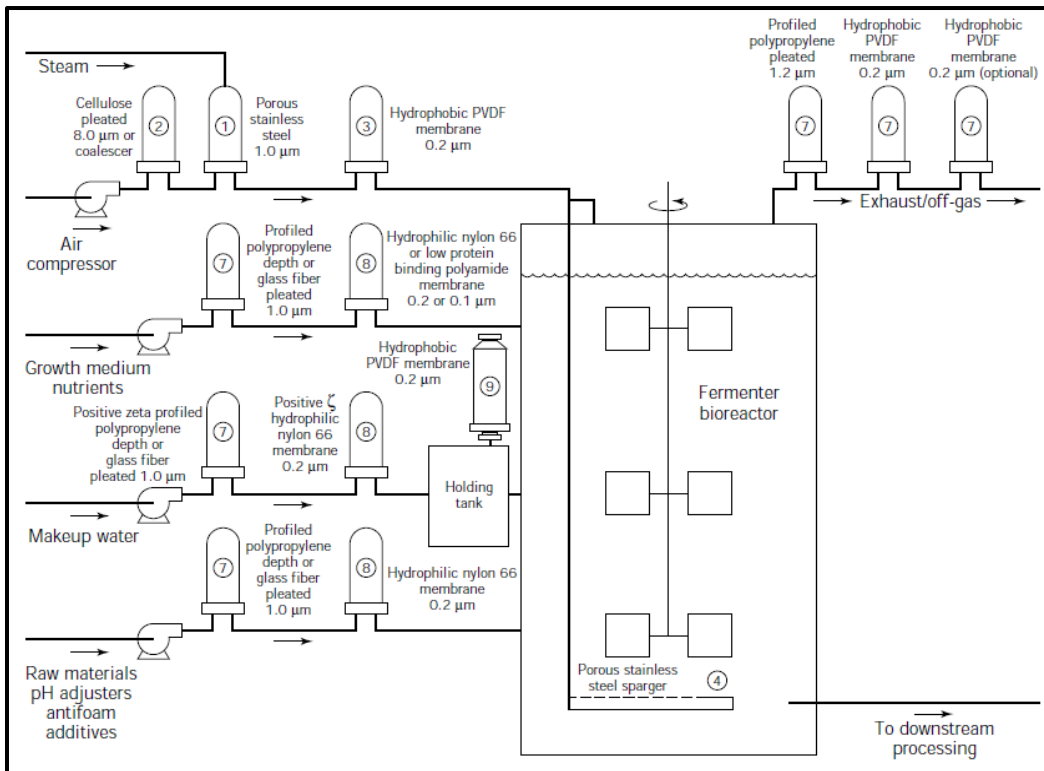


Figura 10 Proceso de fermentación con esterilización por filtración para aire, medio y aditivos.

OTROS PROCESOS DE ESTERILIZACION

Para muchos medios de cultivo de tejidos vegetales se utiliza el Método de **Esterilización en Hornos de Microondas**, aunque este método puede no resultar adecuado si el medio tiene componentes complejos como la avena. Otro método utilizado es la **Esterilización por Haces de Electrones**, ya que los haces de electrones acelerados tienen un gran potencial como bactericida. Este método de esterilización es utilizado con éxito para la esterilización de aparatos médicos desechables y dispositivos con una amplia gama de densidades. El haz de electrones inactiva a los microorganismos que causan la destrucción de las biomoléculas y produce la muerte de los microorganismos por una reacción química indirecta. En general todas las radiaciones ionizantes (rayos X, rayos ultravioletas, o rayos gamma) tienen un mecanismo similar.

También se utiliza la **Esterilización Química**, sobre todo para pipetas y equipos de vidrio. Por ejemplo, la aplicación de un agente oxidante como el **Clorox** al 10% por 20 minutos o más, elimina toda la contaminación de un sistema. Posteriormente el exceso de agente químico debe ser eliminado, de manera que no impida el crecimiento posterior del microorganismo que se inocule al sistema. También se usa la lejía (hipoclorito de sodio) al 3%, que se elimina posteriormente con enjuagues con agua estéril o mediante frotamiento con alcohol etílico (mezcla de 70% de etanol en agua). El alcohol también se utiliza comúnmente para la limpieza de superficies. El uso de cloro, por su parte, debe ser evitado para dispositivos de metal, ya que los corroe rápidamente. En esos casos se utiliza el óxido de etileno en fase gaseosa. El óxido de etileno se utiliza también eficazmente en biorreactores de columna [6].

3. Preparación y propagación de inóculos

El punto de partida de cualquier biorreacción es un recipiente limpio esterilizado, que se llena con medio estéril hasta un 50 – 75 % de su volumen total. Se inocula el medio estéril con un cultivo axénico, en su fase de crecimiento exponencial (Figura 11). El volumen del inóculo generalmente es del orden del 1 al 10% del volumen total del medio, en dependencia del tipo de microorganismo. Si es inferior a esta proporción puede existir un excesivamente prolongado período de latencia, lo que prolongará el período de fermentación. Para evitar estos problemas, el proceso de fermentación se lleva a cabo en varias etapas.

Preservación del inóculo

La preservación de las cepas de producción a lo largo de un período de tiempo largo es un requisito básico para una fermentación práctica. El objetivo no es la mera supervivencia de las cepas, sino preservar su capacidad de formar el producto de interés. Las cepas que se han seleccionados como súper

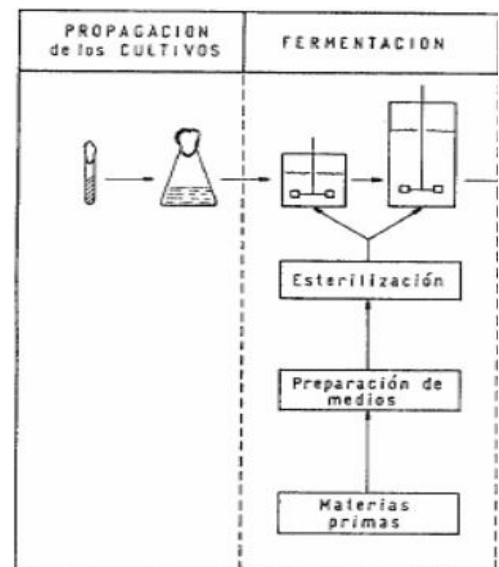


Figura 11 Inoculación del medio de cultivo esterilizado

productoras del producto de interés, frecuentemente degeneran durante las sucesivas transferencias, probablemente como resultado de mutaciones espontáneas, por lo cual se requieren tomar medidas especiales para impedir ese proceso.

Por lo tanto, una de las medidas a tomar es mantener las cepas durante tanto tiempo como sea posible sin que se produzca división celular. Por ese motivo las cepas maestras no deberán ser cultivadas más que una vez cada dos años, controlando los niveles de actividad con cada uso. Las cepas de trabajo derivan de las cepas maestras y también tienen que ser inspeccionadas en relación a su pureza y su capacidad de formar producto, para posteriormente almacenarlas hasta su uso. Los distintos métodos de conservación y mantenimiento de cepas se tratan en detalle en los cursos de Microbiología Industrial [4].

Crecimiento del inóculo

El cultivo preservado se reaviva inicialmente mediante crecimiento en un cultivo líquido en agitación o en medio sólido si se requiere la formación de esporas. Las condiciones utilizadas en el cultivo inicial (composición del medio, temperatura de incubación, etc.) dependerán del proceso específico. Sucesivamente se irá incrementando el volumen del recipiente de cultivo, para conseguir la velocidad de crecimiento adecuada. Es vital ir incrementando el volumen para que a escala industrial se alcancen los resultados óptimos (Figura 12). Si el número de células no está en el número adecuado, la producción no será adecuada. Además, si crece en condiciones diferentes a como crecerá después, existirá una fase de latencia en el fermentador, reduciendo la rentabilidad.

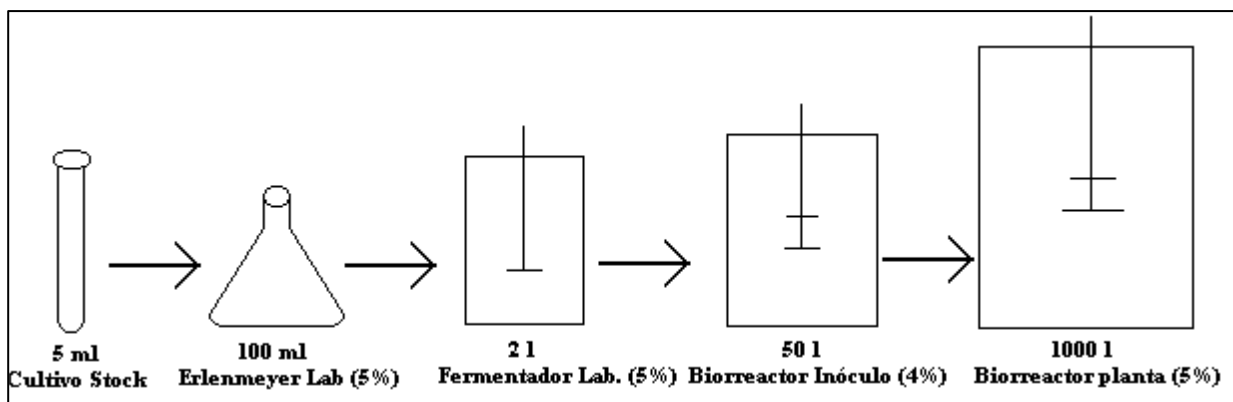


Figura 12 Etapas de desarrollo del inóculo

A fin de obtener suficiente inóculo para el fermentador de producción, se realizan pre-cultivos en fermentadores más pequeños. Si un fermentador de producción se inicia con demasiado poco inóculo, el crecimiento se retrasa y la velocidad de formación del producto puede ser insatisfactoria. La concentración óptima del inóculo para el fermentador de producción determina el número de etapas del pre-cultivo de fermentación que son necesarias. En general se requieren las siguientes concentraciones de inóculo (Tabla 1):

Tabla 1 Porcentaje de inóculo según microorganismo

Microorganismos	% inóculo
Actinomicetos	5 - 10
Otras Bacterias	0.1 - 3.0
Hongos	5 - 10

Dependiendo del proceso específico, para la obtención del volumen necesario de inóculo se utilizan biorreactores de distinto tamaño y no puede darse un esquema general para la inoculación de un fermentador de producción. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de incremento de tamaño de los equipos de producción de inóculo, hasta obtener el volumen necesario para inocular el fermentador de producción.

4. Formulación de Medios

Introducción

La formulación cuidadosa de los medios de cultivo adecuado para el crecimiento del inóculo y para la producción es un pre-requisito para el desarrollo exitoso de un bioproceso [2]. Para su formulación hay que cumplir con los requerimientos nutricionales de los microorganismos y además tener en cuenta diversas restricciones técnico-económicas, ya que una correcta formulación ayuda a maximizar el rendimiento de productos con un mínimo costo de medios. Además, la elección de los medios afecta el Proceso de Pre-tratamiento como al Tratamiento de los Productos, por lo cual hay que formularlos teniendo en cuenta la totalidad de proceso y no solamente la Etapa de Biorreacción. Por ejemplo, si se utiliza una fuente pura de carbono como la glucosa, en lugar de una fuente natural como la melaza, el proceso de pre-tratamiento y purificación final es más sencillo y económico, pero se incrementa apreciablemente el costo de la materia prima.

El medio formulado debe suministrar suficiente carbono, nitrógeno, minerales y otros nutrientes, de manera que se pueda obtener la cantidad requerida de masa celular y productos. Los requerimientos mínimos se estiman a partir de la estequiometría del crecimiento y formación de productos y, en general, se debe cumplir que:

Fuente de Carbono + Fuente de Nitrógeno + minerales + nutrientes específicos (vitaminas, hormonas) + O₂ → masa celular + productos + CO₂ + H₂O.

En la práctica muchos nutrientes se suministran en cantidades muy por encima de los requerimientos mínimos. Para determinar cuáles se suministran en exceso y en qué proporción, es necesario conocer la bioquímica del proceso de formación del producto. Por ejemplo, en la producción de penicilina, es fundamental conocer que se requiere la alimentación de un precursor. En otros casos la adición de trazas de algunos iones metálicos en el medio puede tener un alto impacto, como ocurre en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Esos efectos que afectan o estimulan el rendimiento generalmente se relacionan con inhibición o activación de acciones enzimáticas o por incrementar o suprimir la producción de enzimas específicas, provocadas por los componentes del medio.

En general, el conocimiento de las rutas metabólicas de la formación de los productos determina en gran medida las prácticas industriales de formulación de medios y en la mayoría de los casos

los métodos de tanteo y error han resultado decisivos para lograr la obtención de una formulación de medios que permita el mayor rendimiento de los productos con el menor costo de procesamiento.

En el caso del cultivo de células animales, los medios a utilizar son de mucha mayor complejidad que los utilizados para los cultivos de microorganismos, están mejor definidos y contienen más de 20 amino ácidos, varias vitaminas, azúcares simples como la glucosa como fuente de carbono, sales para el ajuste de la presión osmótica, así como nutrientes y elementos traza. Además, esos medios se suplementan con 5 a 20% en volumen de suero de sangre (e. g. suero bovino, suero fetal de ternero, suero de caballo). El suero suministra hormonas esenciales, lípidos y otros factores de crecimiento.

Los medios naturales como los sueros de sangre, la melaza y el licor de maíz, presentan una gran variabilidad entre plantas, por lo cual se requiere de la aplicación de las modernas técnicas de análisis químico para poder tener el control adecuado que permita mantener la consistencia en el rendimiento de las biorreacciones.

Fuentes de carbono

Las principales fuentes de carbono utilizadas para la formulación de medios de cultivo de microorganismos son los carbohidratos, contenidos en las melazas, extractos de maltas y jugos azucarados, aunque también se utilizan otras fuentes complementarias como los aceites vegetales, etanol y alcanos.

Las melazas, subproducto de la industria azucarera, son una de las fuentes más baratas de carbohidratos y por ese motivo se utilizan muy frecuentemente como aportadores de carbono. Además, las melazas contienen también sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. Un inconveniente de las melazas es que su composición varía en función de la materia prima usada para la obtención del azúcar, las condiciones climáticas, la localidad y el proceso usado en la industria azucarera.

Otra fuente de carbono muy utilizada es el extracto de malta, como se conoce al extracto acuoso de la cebada malteada. Este es un sustrato excelente para muchos hongos, levaduras y actinomicetos. Contiene entre un 90 y un 92 % de carbohidratos, concretamente hexosas, que son glucosa y fructosa, disacáridos como la maltosa y la sacarosa, e incluso trisacáridos como la maltotriosa. El extracto de malta contiene también sustancias nitrogenadas entre las que se incluyen péptidos, proteínas, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. La composición de aminoácidos varía en función del grano usado, pero la prolina siempre constituye más de un 50%.

Uno de los problemas que presentan los sustratos ricos en azúcares es lo que se conoce como reacción de Maillard, que se da a bajo pH y elevadas concentraciones de azúcares reductores. En esa reacción los grupos NH₂ de las aminas, aminoácidos y proteínas, reaccionan con los grupos CHO de los azúcares reductores, lo que resulta en la formación de productos de

condensación de color tostado, que empeora el aspecto del producto y que no pueden ser usados por los microorganismos, lo que reduce el contenido de nutrientes del medio.

Otras fuentes de carbono son el almidón y dextrinas, los que pueden ser metabolizados directamente por los organismos productores de amilasas. En particular el almidón ha adquirido importancia en la producción de etanol. Se utilizan también los líquidos sulfíticos de las papeleras. Se trata de productos residuales de la industria del papel que contienen azúcar. Los líquidos sulfíticos de coníferas contienen entre el 2 y 3 % de azúcares, de los cuales el 80 % son hexosas y el resto pentosas. En el caso de los árboles de hoja caduca, el contenido es principalmente de pentosas.

Otra fuente de carbono que está siendo cada vez más utilizada, debido a su gran disponibilidad y bajo costo es la celulosa, que proviene de la paja, restos de mazorcas, turba y papel. Sin embargo, a menudo este sustrato no puede ser utilizada directamente como fuente de carbono, por lo que se deberá someter a hidrólisis previa, ya sea química o enzimática, convirtiéndola en el jarabe de glucosa, que se usa en la producción de etanol, butanol, acetona e isopropanol.

También se utilizan los aceites vegetales, como aceite de soja, de algodón o de palmera, aunque se utilizan principalmente como ingredientes secundarios, cuando se usa ya una fuente de carbohidratos como principal aporte de energía. De igual forma se utiliza el etanol, que es el producto de la fermentación del almidón sacarificado o de la celulosa, aunque éste puede ser usado como única fuente de carbono o como fuente complementaria para muchos organismos.

Además, se tienen los alcanos de 12 a 18 átomos de carbono, los cuales son rápidamente metabolizados por muchos microorganismos. Estos alcanos son residuos del refinado del petróleo y su uso como alternativa a los carbohidratos depende de su precio.

Fuentes de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno más utilizadas son el amoníaco, la urea o las sales de amonio, aunque en ocasiones existen necesidades específicas de nitrógeno orgánico y en esos casos se usa la soya, carnes cocinadas, suero de leche y digeridos enzimáticos de proteínas, entre otros. También hay que tener en cuenta que muchos aportadores de carbono como las melazas, el extracto de malta y los sueros, también aportan compuestos de nitrógeno.

También se utiliza el líquido de maceración del maíz, que es un subproducto de la producción de almidón a partir del maíz. El extracto concentrado tiene un 4% de Nitrógeno y numerosos aminoácidos, como son: Ala, Arg, Glu, Ile, Tre, Val, Fenil Alanina, Met y Cis. Otra fuente muy utilizada es el extracto de levaduras, que resulta excelente para muchos microorganismos. Se produce a partir de levaduras de panificación, induciendo su autólisis a 50 – 55° C o por plasmólisis en alta concentración de NaCl. Contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos. El glucógeno y la trihalosa se hidrolizan a glucosa durante la producción del extracto.

Otra fuente muy utilizada son las peptonas, que son hidrolizados de proteínas que contienen aminoácidos y péptidos. Se pueden utilizar para el crecimiento de muchos microorganismos, aunque son bastante caras para la producción industrial. No obstante, su uso está muy extendido. Las peptonas pueden producirse tanto de proteínas animales como caseína, gelatina, y queratina, como de proteínas vegetales, obtenidas a partir de semillas de cacahuete, harina de soja, semillas de algodón y girasol. Las peptonas retienen mucho nitrógeno a pesar de ser subproductos de otras industrias. La composición de aminoácidos y de péptidos variará según el origen de la peptona. Por ejemplo, la gelatina es rica en prolina e hidroxiprolina, pero casi no contiene aminoácidos con azufre, en cambio los péptidos de la queratina tienen una elevada concentración en prolina y cisteína, pero carecen de lisina. La composición del producto final está determinada también por el tipo de hidrólisis a que se someta, que puede ser ácida o enzimática. Especialmente se ve afectado el contenido en triptófano, ya que la hidrólisis ácida reduce mucho su nivel.

5. Hidrólisis

Hay procesos en que la materia prima apta para la Biorreacción no está en forma asimilable por los microorganismos y se requiere que la misma se someta a procesos como la hidrólisis para que pueda liberarse el sustrato asimilable. Esto ocurre, por ejemplo, en la producción de etanol a partir de maíz, ya que, a diferencia del proceso basado en la caña de azúcar, requiere el paso previo adicional de la transformación del almidón del maíz a azúcares simples, que luego son los que van a alimentar el proceso de fermentación. Este proceso de transformación se realiza

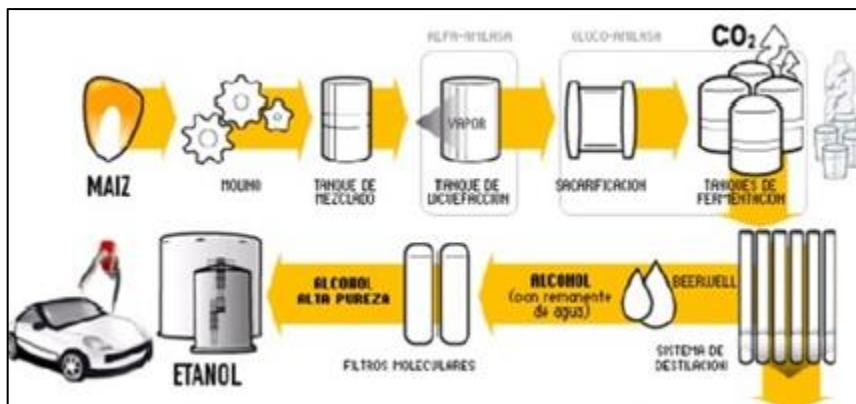


Figura 13 Producción de etanol a partir de maíz con hidrólisis previa

mezclando el vegetal triturado con agua. A continuación se le añade primero la enzima alfa amilasa y después la glucoamilasa se calienta la papilla obtenida a 120 – 150 °C. Posteriormente se cuela la masa y se envía a los reactores de fermentación (Figura 13) [7].

Ahora bien, hay variantes del proceso anterior en que el proceso de sacarificación se produce de manera conjunta con la fermentación y en ese caso la hidrólisis deja de ser un Proceso de Tratamiento Previo.

Por otra parte, el proceso de producción de etanol a partir de celulosa es aún más complejo, ya que primero hay que pre-tratar la materia vegetal para que la celulosa pueda ser luego atacada por las enzimas hidrolizantes. El Proceso de Pre-Tratamiento, en este caso, puede consistir en una combinación de trituración, pirólisis y ataque con ácidos y otras sustancias. Esto es uno de los factores que explican por qué los rendimientos en etanol son altos para la caña de azúcar, mediocres para el maíz y bajos para la madera.

3 Etapa de Biorreacción

Introducción

Una de las actividades centrales de la Ingeniería de Bioprocesos es sin duda alguna el cultivo, ya sea de microorganismos, células o tejidos, para la generación de una gran cantidad de productos dentro de una amplia variedad de aplicaciones, proceso que se lleva a cabo en la **Etapa de Biorreacción**. En términos generales, los productos del cultivo celular se pueden dividir en tres grandes categorías: productos generados por las células cultivadas, las propias células y productos generados por transformaciones celulares. En la Tabla 2 se muestran tales categorías y los campos de aplicación de los productos generados [8].

Tabla 2 Tipos de Productos de Cultivos de Células y sus aplicaciones

<i>Categoría</i>	<i>Ejemplos de productos</i>	<i>Area de aplicación</i>
Metabolitos o productos generados por células cultivadas	Ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, proteínas, solventes, colorantes, etanol, vitaminas, nucleótidos, virus	Alimentos, química, energía farmacéutica (diagnóstico, terapia, profilaxis), cosméticos, agricultura
Las propias células cultivadas como productos	Proteína unicelular, tejidos y órganos para trasplantes, bioinsecticidas	Alimentos, medicina, agricultura
Biotransformaciones efectuadas por las células cultivadas o sus componentes	Tratamiento de agua, aire y suelo Transformaciones enzimáticas	Biorremediación, contaminación ambiental, alimentos, síntesis química

Si bien la generación del mejor ente biológico (cepas seleccionadas o recombinantes y proteínas mutantes) para un bioproceso en particular es tarea de la Microbiología, Ingeniería Genética e Ingeniería de Proteínas entre otras disciplinas, la Ingeniería de Bioprocesos es la encargada de asegurar que el desempeño de tal ente biológico sea el más adecuado y eficiente. Con ese objetivo se asegura un entorno propicio, para lo cual se recurre al Diseño de Biorreactores y a la definición de las estrategias para operarlos y controlarlos. El término **Biorreactor** o **Fermentador** se refiere al equipo donde se efectúa la transformación biológica (biorreacción), particularmente el crecimiento celular, y aunque aquí se usarán los dos términos indistintamente, en general el segundo se aplica sólo para el caso de cultivos microbianos.

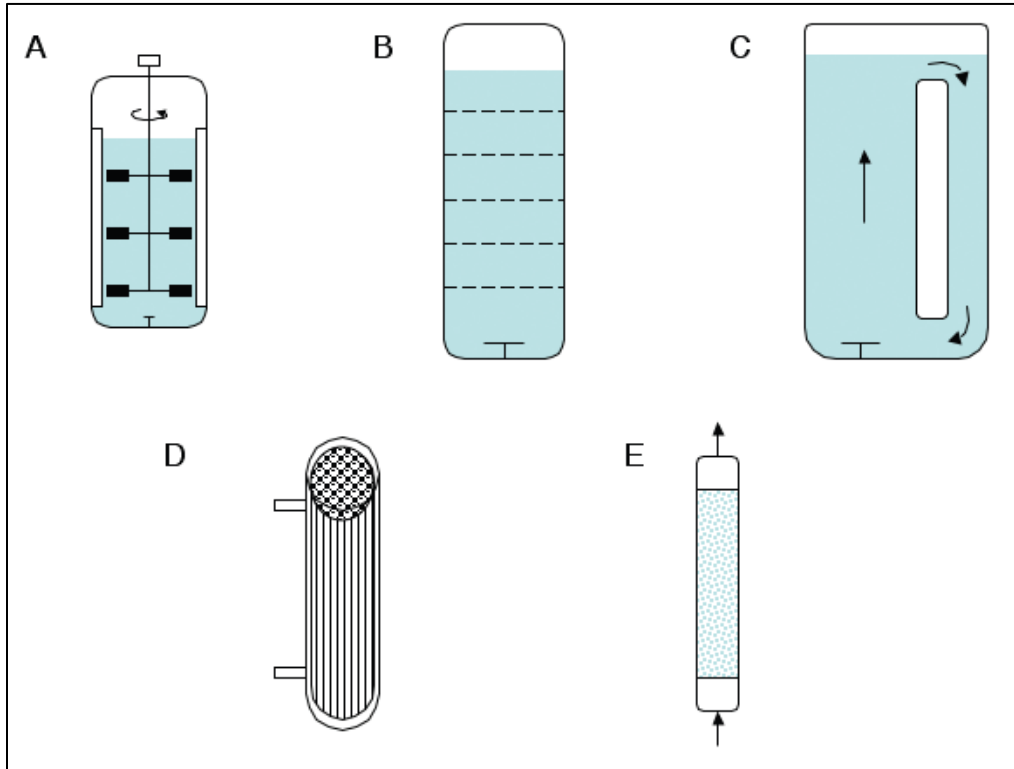
Un **Biorreactor** tiene como función principal contener al ente biológico en un entorno óptimo garantizando la seguridad tanto del medio ambiente como de los operadores y del propio cultivo.

Para esto, la mayoría de los biorreactores están diseñados para ser esterilizados y mantener la esterilidad durante su operación, por lo que generalmente se construyen de acero inoxidable con el fin de poder soportar altas temperaturas y presión, aunque existen sistemas abiertos como diques, fosas y demás obras civiles de gran escala empleadas comúnmente para sistemas de tratamiento de aguas u otras aplicaciones en las que no es necesario mantener una población axénica.

Tipos de Biorreactores

Para biorreactores de pequeña escala (menores a los 15 L) el material de construcción preferido es el vidrio. También existen ciertos biorreactores especializados, como cartuchos de fibras huecas, construidos de material plástico desechable y que son esterilizados por métodos distintos al calor (por ejemplo, agentes químicos o radiación). Además de lo anterior, un biorreactor ideal deberá ser capaz de mantener condiciones adecuadas de homogeneidad, poseer alta capacidad para transferir calor y oxígeno (en caso de cultivos aerobios), permitir el establecimiento práctico de estrategias de operación, medición y control de variables, y poderse escalar fácilmente. Para esto se ha ideado una gran cantidad de distintos diseños de biorreactores, cada uno con diversas ventajas y desventajas y cuya selección dependerá del cultivo y producto particular en cuestión.

Los componentes comunes a casi cualquier tipo de biorreactor son: barreras físicas que garantizan la contención biológica (filtros, empaques, sellos, trampas de vapor, etc.); sistema de transferencia de oxígeno (difusores de gases e impulsores); sistema de transferencia de energía calorífica o calor para esterilización y/o enfriamiento (chaqueta o serpentín); sistema de transferencia de momentum para mantener la homogeneidad (impulsores, deflectores y difusores de gases); puertos para la inoculación, la toma de muestra, la adición de reactivos (nutrimentos, antiespumante, base, ácido) y la inserción de dispositivos y sensores de medición; y mirillas y equipo de seguridad (válvulas de alivio, discos de ruptura). Además, los biorreactores tienen múltiples conexiones a instrumentación y equipo de medición para control del bioproceso. Algunos diseños representativos de biorreactores se ilustran en la Figura 14 [8].



A, tanque agitado; **B**, columna burbujead; **C**, tanque neumático (“air-lift”); **D**, sistema de fibras huecas; **E**, cama empacada. La flecha en **A** indica el movimiento rotatorio de la flecha que soporta los impulsores mientras que las flechas en **C** indican el patrón de flujo del medio de cultivo cuando los gases se burbujan por el conducto principal. Las líneas punteadas en **B** representan platos perforados que funcionan como distribuidores de gases. En el reactor de fibras huecas (**D**) las células en general se inmovilizan en el exterior de las fibras mientras que medio de cultivo se hace fluir por el interior, creándose una difusión de nutrientes desde el interior de las fibras hacia las células; y en el sentido contrario de productos y desechos metabólicos tóxicos. En los reactores tipo cama empacada (**E**) existe una gran variedad de soportes, desde muy sencillos como vidrio, cerámica y acero inoxidable, hasta sofisticados como matrices poliméricas recubiertas de colágena.

Figura 14 Principales diseños de Biorreactores

Existen biorreactores agitados mecánicamente (figura 14A) o neumáticamente tales como columnas de burbujeo y air-lift (figura 14B y C, respectivamente). El patrón de flujo de los biorreactores agitados mecánicamente dependerá del impulsor usado, los cuales hay disponibles en una gran variedad de diseños. A su vez, el patrón de flujo circulatorio, característico de los biorreactores tipo air-lift, se establece gracias a la diferencia de densidades del medio entre la sección ascendente donde se coloca el difusor y el tubo de descenso. En los tres tipos de biorreactores anteriores las células se cultivan en forma suspendida o inclusive unidas a micro-carreadores que también se encuentran suspendidos.

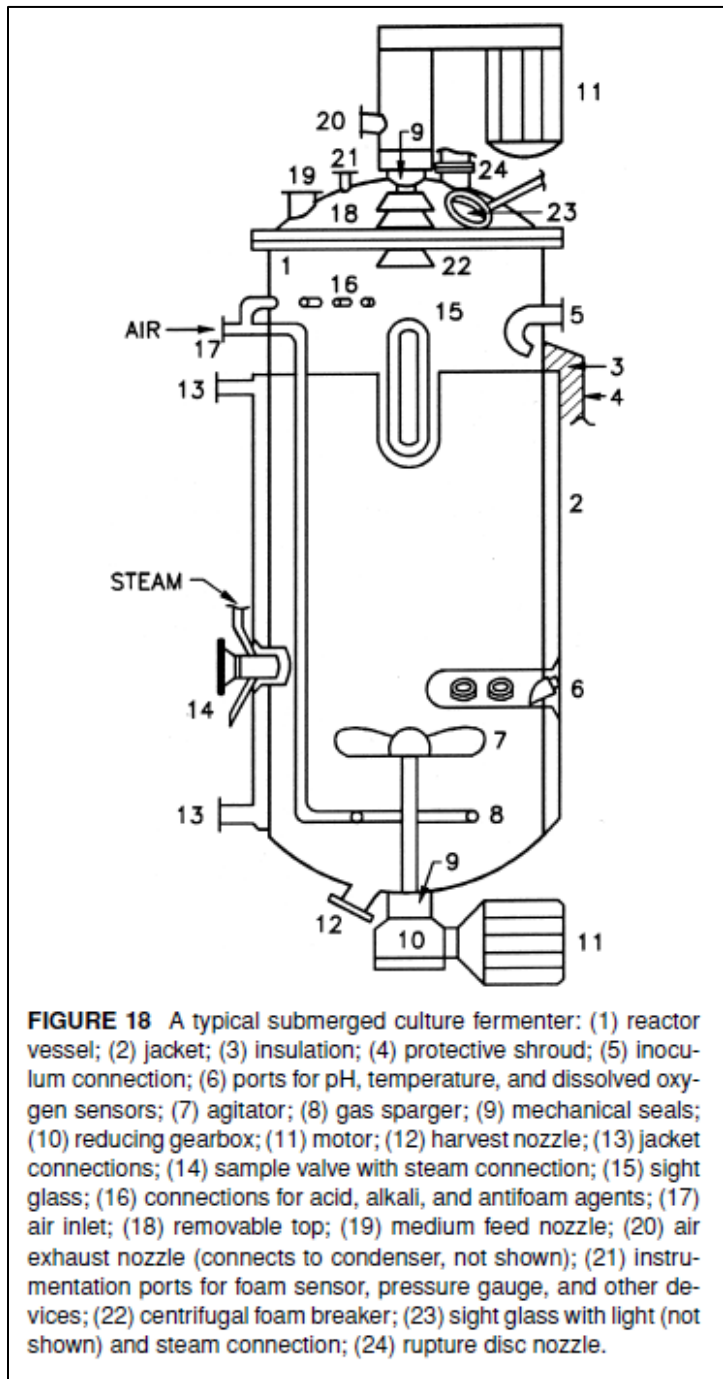


Figura 15 Biorreactor Tipo Tanque Agitado

Modos de Operación de los Biorreactores

La forma en que un cultivo se opera y alimenta tiene un profundo impacto en los productos de las fermentaciones. De igual forma, la alimentación de reactivos y las estrategias operacionales de los reactores afectan el rendimiento de los biorreactores enzimáticos y de los que usan

En contraste, existen reactores con células inmobilizadas, como los mostrados en las figuras 14.D y E, en donde las células crecen adheridas a una matriz fija. Estos sistemas son utilizados para células adherentes, como por ejemplo células animales dependientes de anclaje, y donde el producto de interés es extracelular. Los biorreactores de células suspendidas tienen la ventaja de ser sistemas homogéneos, permitiendo un muestreo directo de variables ambientales, incluyendo las propias células, por lo cual es posible establecer mediciones y controles sencillos y estrictos. Además, son fácilmente escalables.

Por otro lado, los biorreactores con células (o enzimas) inmobilizadas tienen la ventaja de alcanzar altas concentraciones celulares y por ende altas productividades, además de prestarse fácilmente para operaciones continuas como la perfusión (ver modos de operación más adelante). No obstante, tienen el inconveniente de ser sistemas heterogéneos por lo que es común la presencia de gradientes ambientales tanto en la dirección radial como axial. Asimismo, el muestreo, particularmente de células, es problemático o imposible por lo que acaban siendo sistemas de difícil operación y escalamiento.

Como ejemplo de configuración típica, se mostrará la configuración Biorreactor Tipo Tanque Agitado (Figura 15) [9].

biomasa no viable como biocatalizador. La mayoría de los biorreactores para crecimiento microbiano y cultivo de otras células se operan como equipos discontinuos o discontinuos alimentados. Un cultivo discontinuo se inicia a partir de la inoculación de un medio previamente esterilizado y enfriado, en un biorreactor completamente mezclado (Figura 16 a). La composición del medio en el fermentador cambia continuamente según los nutrientes se consumen para producir biomasa y metabolitos. El caldo se cosecha después de que se cumple el tiempo de operación discontinua diseñado. El volumen de caldo en un fermentador discontinuo permanece constante, si no se consideran las pérdidas por evaporación.

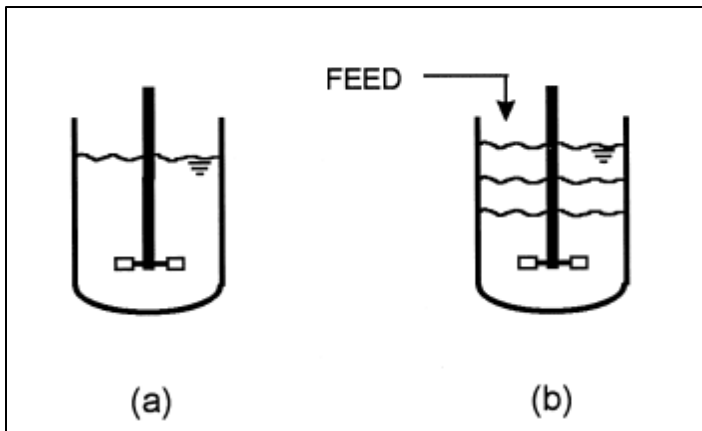


Figura 16 Modos de Operación de Biorreactores: (a) discontinuo perfectamente mezclado (b) discontinuo alimentado

El cultivo discontinuo alimentado es idéntico al cultivo discontinuo excepto en que se le añade una alimentación al caldo de manera continua o discontinua (Figura 16 b). De esa forma el volumen de caldo aumenta con el tiempo y generalmente el volumen de alimentación se incrementa en el tiempo, para satisfacer la demanda de una población creciente de células. El caldo se cosecha al final del periodo discontinuo definido.

Otro modo de operación muy utilizado es el cultivo continuo completamente mezclado en estado estacionario. En este tipo de cultivo (Figura 17 a) la composición del caldo no varía con el tiempo ni con la posición en el biorreactor. Generalmente este tipo de cultivo comienza como cultivo discontinuo y posteriormente, cuando se ha obtenido suficiente concentración de biomasa, se comienza la alimentación continua. La alimentación se añade de manera continua y con una tasa constante. El volumen del caldo no varía, ya que el flujo de cosecha se iguala con el flujo de alimentación.

En ocasiones este cultivo se puede llevar a cabo con la recirculación al biorreactor de una parte de la biomasa cosechada (Figura 17 b). Ese arreglo es especialmente útil cuando se necesitan diferentes condiciones ambientales en diferentes etapas del

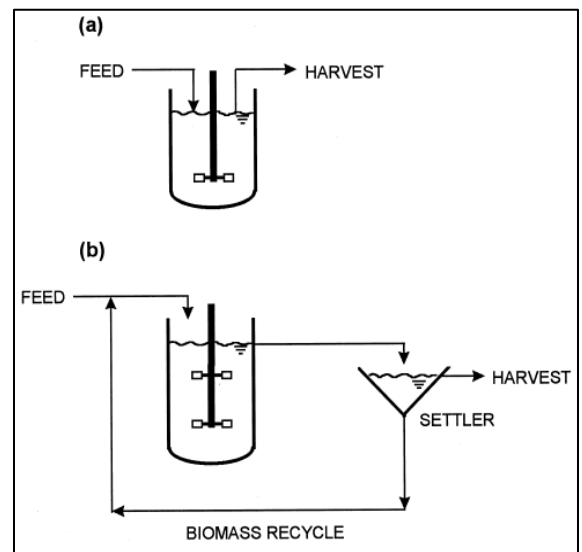


Figura 17 Modos de operación de Biorreactores: (a) biorreactor perfectamente mezclado de flujo continuo (b) biorreactor continuo perfectamente mezclado con recirculación de biomasa

proceso, por ejemplo. cuando los requerimientos de crecimiento de la biomasa difieren de los de la síntesis de un metabolito por las células.

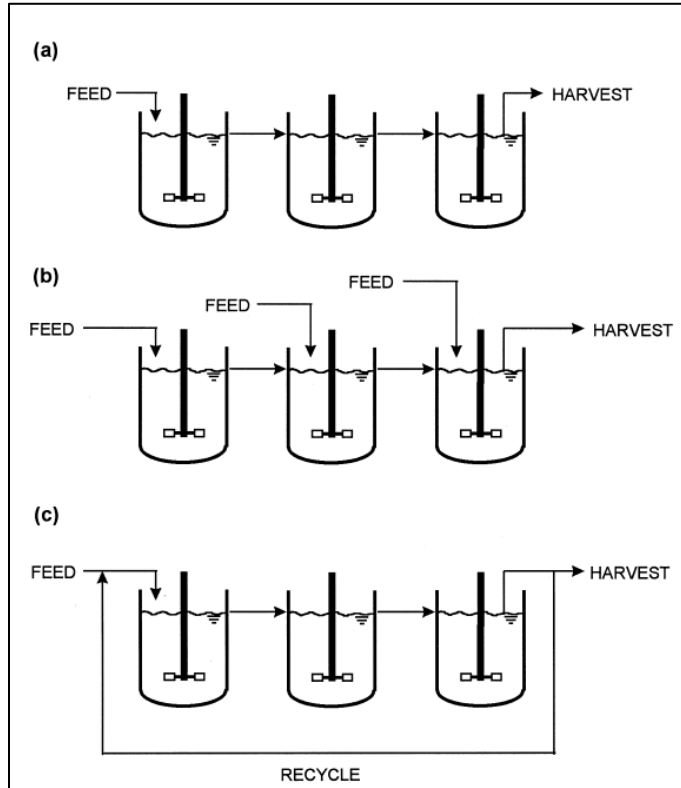


Figura 18 Modos de operación de Biorreactores: (a) serie de biorreactores de flujo continuo perfectamente mezclados, (b) uso de alimentaciones diferentes en diferentes etapas, (c) serie de biorreactores de flujo continuo perfectamente mezclados con recirculación de biomasa.

Un arreglo de múltiples etapas continuas de biorreactores bien mezclados puede ser alimentado con diferentes alimentos y compuestos precursores en las diferentes etapas, como se muestra en la Figura 18 b, dichas series de biorreactores pueden emplear también el reciclo de la biomasa (Figura 18c) en la primera etapa o en una o más de las otras etapas.

Los procesos de flujo continuo en ocasiones utilizan un biorreactor de flujo pistón, en el cual hay muy poco mezclado de los elementos del fluido en la dirección del flujo (Figura 19 a). Este tipo de flujo se alcanza típicamente en tubos largos y canales. La composición del caldo en un reactor flujo pistón en estado estacionario no cambia con el tiempo en una locación dada, sin embargo, la composición cambia con la posición en la dirección del flujo en el biorreactor. Un reactor de flujo pistón equivale a una serie de muchos biorreactores de flujo continuo perfectamente mezclados (Figura 18 a). En términos cinéticos, un biorreactor de flujo pistón es equivalente a un biorreactor discontinuo que tenga el mismo tiempo de

residencia, o sea que el caldo pase dentro del biorreactor de flujo pistón, el mismo tiempo que dentro del biorreactor perfectamente mezclado.

Un biorreactor de tipo flujo pistón para la producción de biomasa debe ser inoculado continuamente o una porción de la biomasa cosechada debe ser recirculada a la entrada del biorreactor (Figura 19 b), para impedir eliminación (lavado) del cultivo por la alimentación estéril. A veces se utiliza la alimentación en múltiples puntos, como se muestra en la Figura 19c.

La operación de un reactor en flujo continuo en el cual las células se recirculan o se retienen dentro del biorreactor se conoce como cultivo de perfusión. Para lograr la retención de las células se utilizan muchas clases de equipos, los cuales pueden estar colocados en el interior o en el exterior del biorreactor. En los procesos de tratamiento de residuales en muchas ocasiones se utilizan tanques externos de sedimentación (Figura 20 b) para reciclar la biomasa.

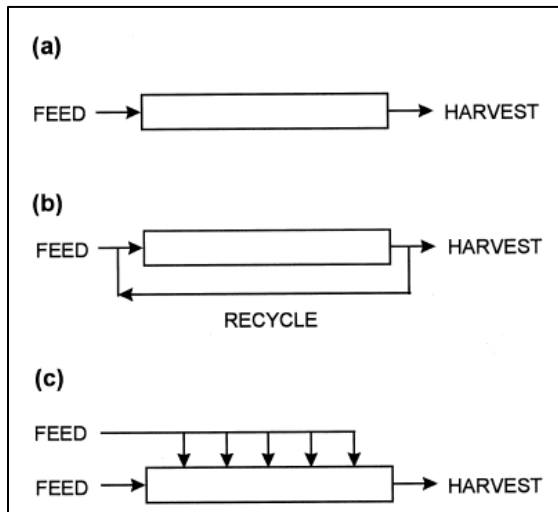


Figura 20 Modos operacionales: (a) continuo flujo pistón, (b) continuo de flujo pistón con recirculación de biomasa, (c) flujo pistón con múltiples puntos de alimentación.

Sedimentadores externos e internos de mayor eficiencia se utilizan también en los cultivos de células animales y vegetales (Figura 20 a y b). A causa de la menor diferencia en densidad y diámetro entre las células animales viables y no viables, el sedimentador de canal inclinado (Figura 20 C) puede retener preferentemente las células viables en el reactor mientras que permite el lavado de las células no viables.

Otro dispositivo comúnmente utilizado para la retención parcial de las células animales es el *filtro espín* (Figura 21). Un *filtro espín* es un cilindro formado por mallas de alambre. Las aberturas de la malla de alambre (por ejemplo, 25µm) son significativamente más grandes que las células, las que se retienen por un mecanismo hidrodinámico que la requiere rotación rápida (por ejemplo 500 rpm) del *filtro espín*. El medio

prácticamente libre de células sale del interior de la zona rotatoria. Dependiendo de las especificaciones del diseño y de la operación, un *filtro espín* puede retener preferentemente las células viables. Además, se han desarrollados *equipos para sedimentación acústica no invasiva*, que se instala en la salida de la tubería de cosecha del biorreactor. Ese equipo utiliza las ondas de sonido para agregar las células para que sedimenten de retorno al recipiente del biorreactor.

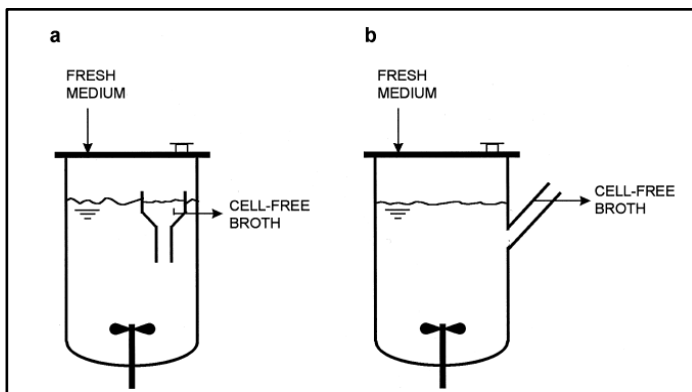


Figura 19 Retención de células por sedimentación en cultivo de perfusión: (a) sedimentador interno, (b) canal inclinado.

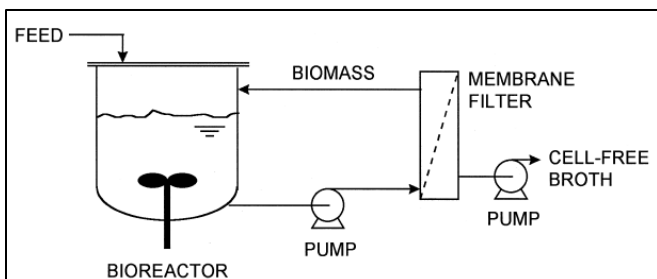


Figura 21 Reciclo total de biomasa utilizando un dispositivo de microfiltración.

Los *filtros espín* y los *equipos de sedimentación* no retienen todas las células dentro del biorreactor y siempre ocurren pérdidas de células. Para lograr una retención total de la biomasa se requiere utilizar *un microfiltro externo* de manera de poder cosechar continuamente una corriente libre de células, como se muestra en la Figura 22. Los esquemas operacionales de biorreactores identificados aquí son los más comunes, aunque variaciones en esos esquemas se encuentran ocasionalmente [9].

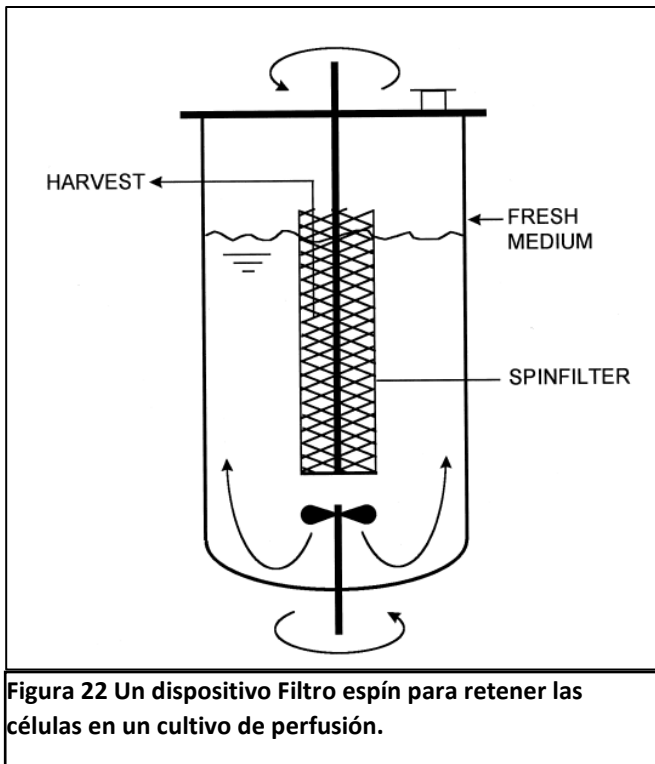


Figura 22 Un dispositivo Filtro espín para retener las células en un cultivo de perfusión.

4. Procesos de Tratamiento de Productos (Downstream)

Introducción

Los Bioprocesos tratan materias primas y generan productos útiles. Las operaciones individuales que cambian o separan los componentes se denominan operaciones unitarias y se han estudiado en los primeros Temas de este Módulo. Aunque las operaciones unitarias específicas en cada bioproceso varían de fábrica en fábrica, cada esquema de bioproceso puede verse como una serie de operaciones unitarias que aparecen una y otra vez en diferentes sistemas. Por ejemplo, la mayoría de los bioprocesos involucran una o más de las siguientes operaciones: centrifugación, cromatografía, enfriamiento, cristalización, diálisis, destilación, secado, filtración, calentamiento, humidificación,

separación con membranas, molienda, mezclado, precipitación, manejo de sólidos y extracción de solventes [10].

En un bioproceso típico las materias primas se alteran significativamente por los procesos que ocurren en el biorreactor. Sin embargo, los cambios físicos que se realizan antes y después de los bioprocesos son también importantes para preparar los sustratos para la bioreacción (Etapa de Tratamiento Previo) y, para extraer y purificar los productos deseados de los caldos de cultivo. Los caldos de fermentación son mezclas complejas de componentes que contienen los productos en solución diluida y por lo tanto su procesamiento es complejo. En los bioprocesos, cualquier tratamiento a que se someten los caldos después de la fermentación se conocen como Procesos de Tratamiento de los Productos, también llamados por su nombre en inglés, Downstream Process.

Los Procesos de Downstream son decisivos para reducir los costos de los Bioprocesos, ya que en la mayoría de los casos el costo del tratamiento de los productos representa entre el 60 y el 80% de los costos del proceso de producción. Por lo tanto, el éxito o el fracaso de un nuevo producto dependen mucho de la eficiencia que se logre en la Etapa de Downstream. En la Figura 23 se resumen las distintas posibilidades existentes para el procesamiento de los productos de las bioreacciones, en dependencia de si el producto de interés está en el interior de las células o en el caldo de fermentación [10].

Etapas de los Procesos de Tratamiento de los Productos

A continuación se describirán las etapas de operación más utilizadas en los Procesos de Tratamiento:

Separación de las Células: Comúnmente la primera etapa en la recuperación del producto de la biorreacción, es la separación de las células del caldo de fermentación. Eso es necesario porque la biomasa en sí puede ser el producto deseado, como por ejemplo la levadura panadera, pero también se requiere cuando el producto deseado está en la fase líquida. Para esta separación las operaciones unitarias más utilizadas son la filtración y la centrifugación. Entre los equipos de filtración a utilizar se incluyen también la ultra y la micro filtración.

Ruptura celular: En los casos que los productos de interés están en el interior de las células, se lleva a cabo el proceso de ruptura celular, en la cual se utiliza principalmente las operaciones de homogeneización, molino de bolas y el shock osmótico.

Aislamiento primario: Aunque hay disponible una gran variedad de técnicas disponibles para la separación primaria de los productos extraídos del interior de las células o de los caldos libres de células, el método a utilizar está en dependencia de las propiedades físicas y químicas de los productos y del material que lo acompañe. Otro rasgo distintivo de esta etapa del proceso es que típicamente trata grandes volúmenes de material y es relativamente no-selectivo. Las operaciones unitarias más utilizadas para el aislamiento primario son la adsorción, extracción en fase líquida y precipitación.

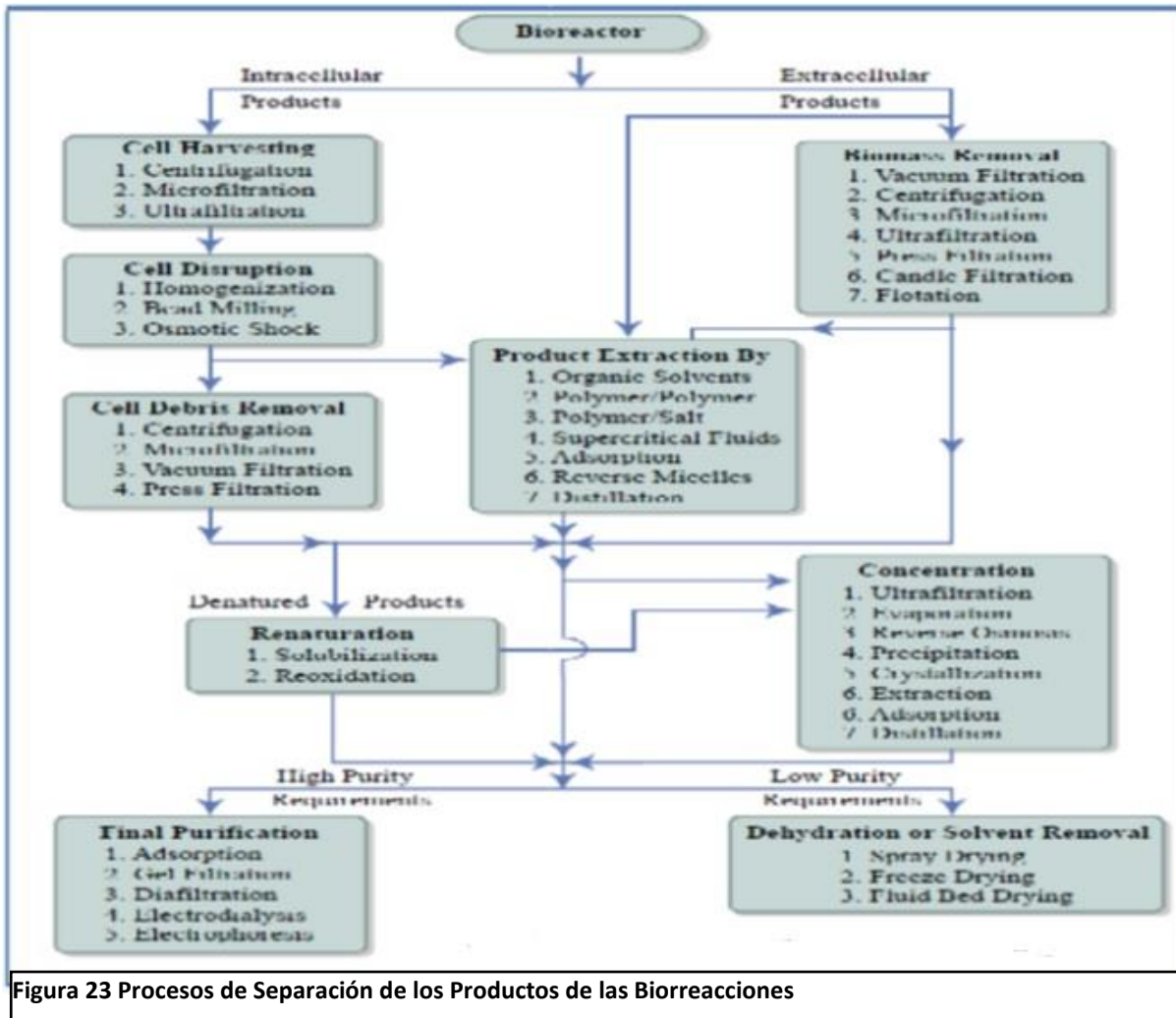


Figura 23 Procesos de Separación de los Productos de las Biorreacciones

Purificación: Los procesos de purificación son altamente selectivos, ya que logran separar los productos de impurezas que tienen propiedades muy similares. Las operaciones unitarias más utilizadas en esta etapa de Tratamiento de los Productos son la cromatografía, ultrafiltración y precipitación fraccional.

Aislamiento final: La pureza final requerida depende de la aplicación que va a tener el producto y es la que determina la secuencia de procesos necesarios. Una secuencia de operaciones unitarias típica para obtener productos de alta calidad como los productos farmacéuticos, es la que comienza con cristalización y continúa con centrifugación o filtración y secado.

Algunas operaciones unitarias que se usan con frecuencia en la Separación de Productos.

Filtración

En la filtración las partículas sólidas se separan de la mezcla sólido-líquido al forzar el paso de la mezcla a través de un medio filtrante o tela de filtro, donde se retienen las partículas. Los sólidos se depositan en el filtro (*torta de filtrado*) y según el depósito incrementa en profundidad, se produce resistencia a la continuación de la filtración. La filtración se lleva a cabo con la ayuda de vacío o con equipamiento de presión positiva, La diferencia de presión ejercida a través del filtro para separar el fluido de los sólidos se denomina *caída de presión de filtración*.

Los caldos de fermentación pueden ser difíciles de filtrar a causa de del pequeño tamaño y naturaleza gelatinosa de las células y el comportamiento viscoso no-Newtoniano de los caldos. Muchas tortas de filtrado microbianas son compresibles, o sea la porosidad de la torta disminuye según incrementa la caída de presión a través del filtro. Eso puede constituir un serio problema

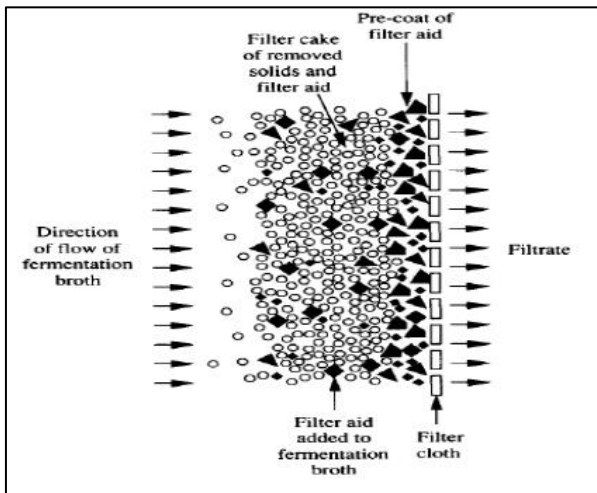


Figura 24 Dos vías de utilización de los auxiliares de filtrado

ya que se reduce la tasa de filtrado y se incrementa la pérdida de producto. En los procesos de filtración en los bioprocesos se utilizan frecuentemente *auxiliares de filtrado*, principalmente la tierra diatomácea, con lo cual se consigue mejorar la eficiencia de filtración. Los auxiliares se aplican en dos vías. Como se muestra en la Figura 24, el auxiliar de filtrado puede utilizarse como una pre-cubierta del medio filtrante para prevenir el bloqueo del filtro por los sólidos, evitando que los sólidos se acumulen en los poros de la tela y la obstruyan. El auxiliar de filtrado puede añadirse también en el caldo de fermentación, para incrementar la porosidad de la torta según se va formando.

Centrifugación

La centrifugación (Figura 25) se utiliza para separar materiales de diferente densidad cuando se requiere una fuerza mayor que la gravedad, que es la que actúa en los procesos de sedimentación. En los bioprocesos la centrifugación se utiliza para extraer las células de los caldos de fermentación, para eliminar los residuos de la ruptura celular, para coleccionar precipitados y para preparar medios de como las melazas, que requieren de una clarificación previa. La centrifugación es más efectiva cuando las partículas que se van a separar son grandes, la viscosidad del líquido es baja y la diferencia de densidad entre las partículas es alta y su funcionamiento se mejora cuando se utiliza un radio de centrífuga grande y una alta velocidad rotacional. Cuando se necesita centrifugar células, las partículas son muy pequeñas, la

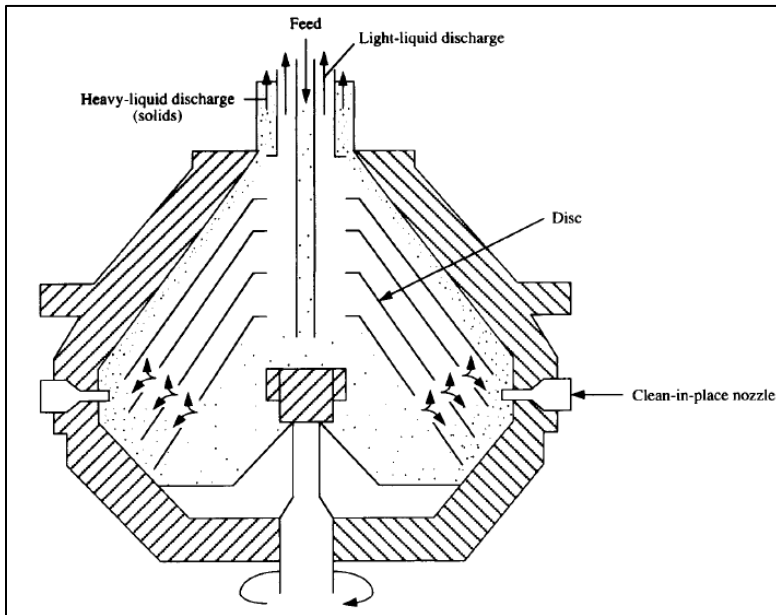


Figura 25 Centrifuga de tazón con múltiples discos

viscosidad del medio puede ser relativamente alta y la densidad entre las partículas a separar y el fluido es muy similar, lo que dificulta la operación.

Ruptura celular

La ruptura celular resulta imprescindible para liberar los productos como las enzimas y las proteínas recombinantes que permanecen dentro de la biomasa. Para realizar ese proceso se dispone de una diversidad de métodos (Figura 26). Entre las opciones mecánicas se encuentran el molido con abrasivos, la agitación de alta velocidad, bombeo con alta presión y ultrasonido. También se utilizan métodos no mecánicos como

choque osmótico, congelación y descongelación y digestión enzimática de las paredes celulares, así como tratamientos con solventes y detergentes.

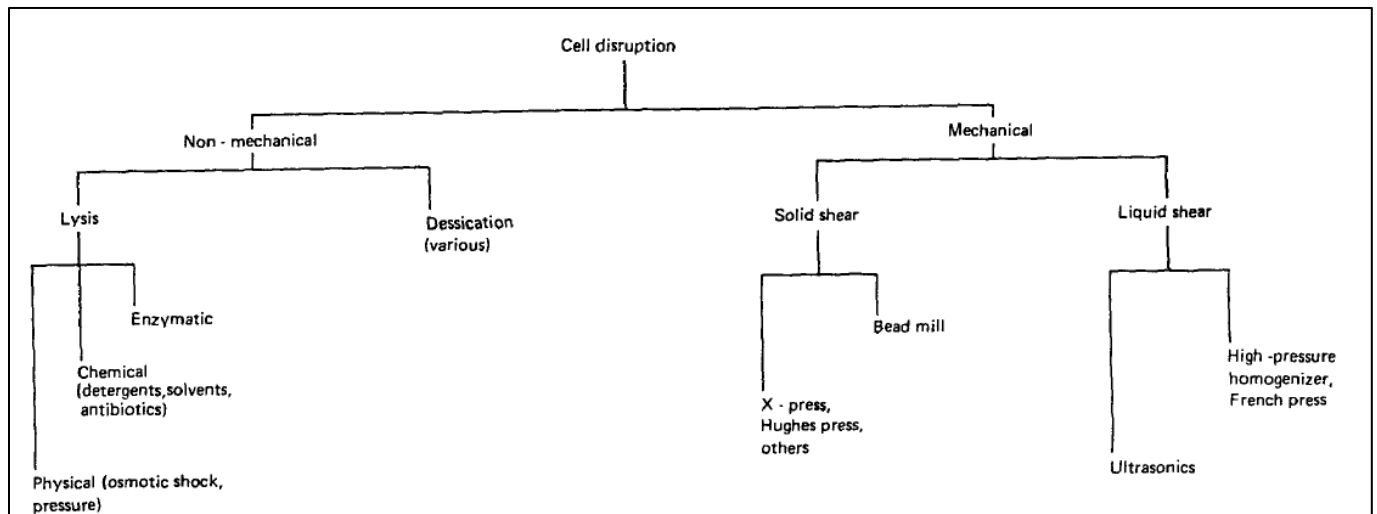
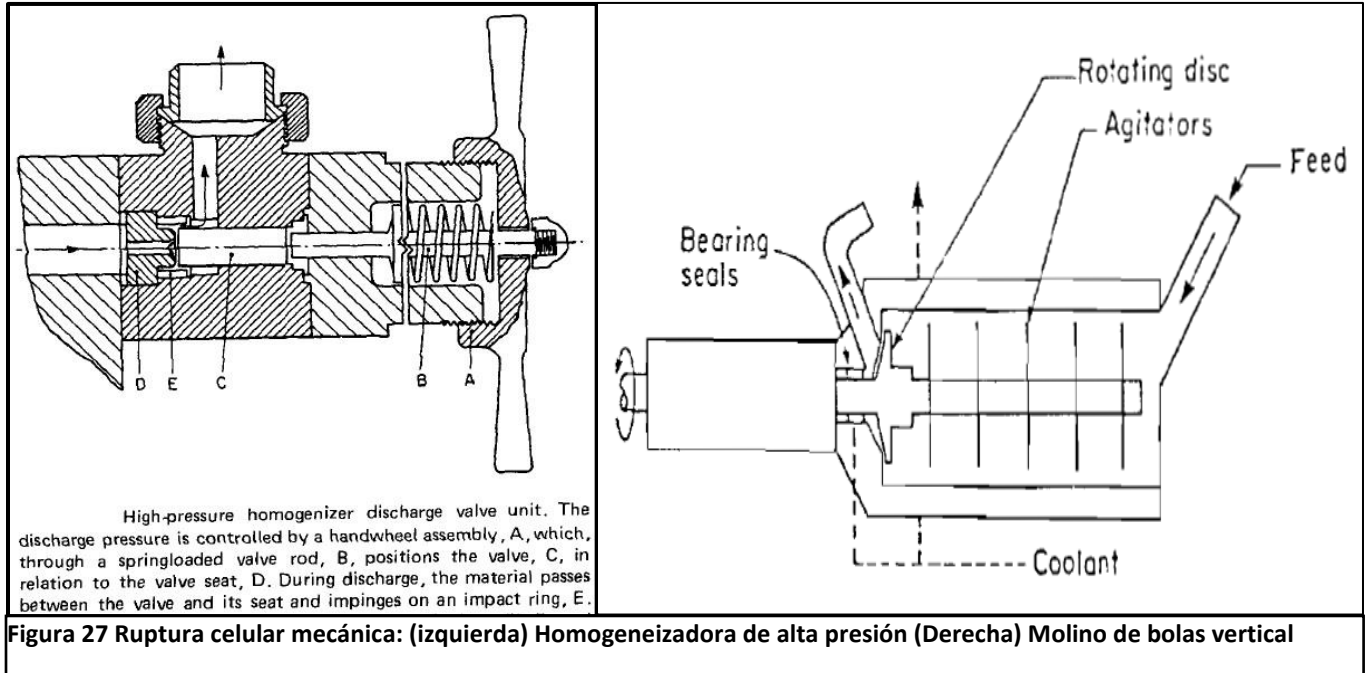


Figura 26 Clasificación de los métodos para la ruptura celular

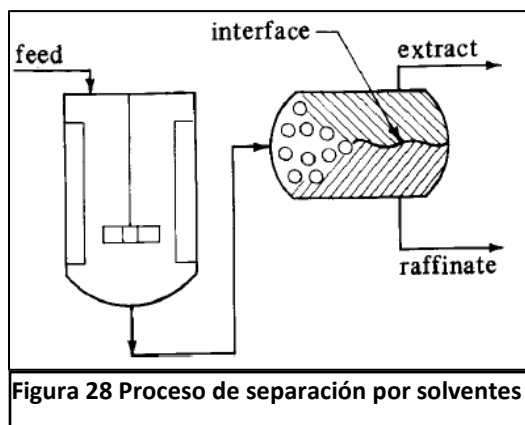
Para la ruptura celular mediante bombas de alta presión (homogeneizador) (Figura 27 izquierda) se incorpora una válvula ajustable con orificio de restricción, a través del cual se fuerzan las células con presiones por encima de 550 atm. El homogeneizador se aplica frecuentemente para la ruptura celular, aunque la válvula homogeneizadora puede llegar a bloquearse cuando se procesan organismos altamente filamentosos. Otro equipo mecánico de ruptura celular que se

utiliza con frecuencia es el molino de bolas (Figura 27, derecha), de los que también existen variantes para escala de laboratorio.

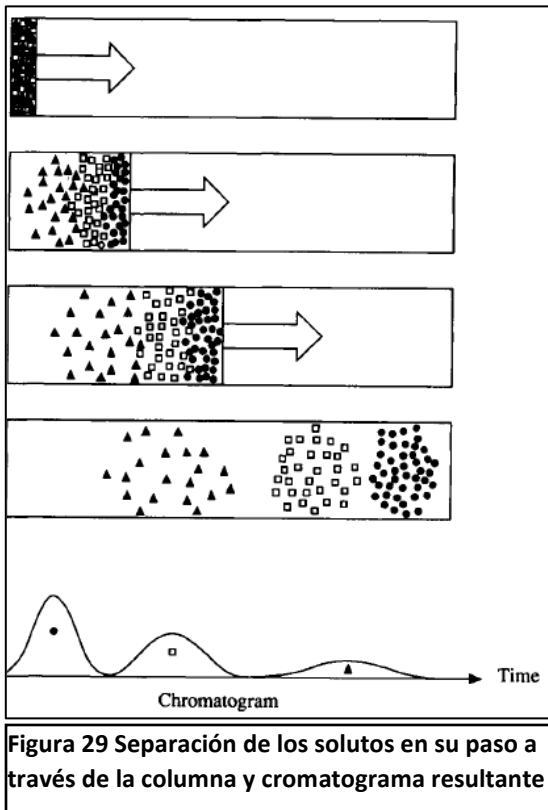


Extracción líquida de dos fases acuosas

En la extracción líquida de productos de biorreacción los componentes disueltos en líquidos se recuperan por transferencia con un solvente apropiado. Como ejemplo se tiene la extracción de penicilina del caldo acuoso con el empleo de solventes como el acetato de butilo, acetato de amilo o metil isobutil cetona y el aislamiento de la eritromicina utilizando como solvente el amil o pentil acetato. Las técnicas de extracción por solventes se aplican también para la recuperación de esteroides, purificación de vitamina B12 de fuentes microbianas y aislamiento de alcaloides como la morfina y la codeína de materia prima vegetal.



Cromatografía



La cromatografía es un procedimiento de separación para resolver mezclas y aislar componentes. La base de la cromatografía es la migración diferencial, o sea el retardo selectivo de las moléculas de un soluto durante su paso a través de una capa de partículas de resina. Mientras el solvente fluye a través de la columna, los solutos viajan a diferentes velocidades en dependencia de la afinidad relativa de cada uno de los componentes con relación a las partículas de resina. Como resultado se separarán los componentes en grupos y aparecerán a la salida de la columna, en tiempos diferentes. La trayectoria de los picos de soluto que emergen de la columna cromatográfica en función del tiempo se denomina un cromatograma. El fluido que transporta el soluto a través de la columna o que se utiliza para la elución se denomina fase móvil, mientras que el material que permanece dentro de la columna y provoca la separación se denomina fase estacionaria.

La cromatografía es una técnica de alta resolución y por lo tanto es adecuada para recuperar productos terapéuticos y farmacéuticos de alta pureza. Los

métodos cromatográficos disponibles para la purificación de proteínas, péptidos, amino ácidos, ácidos nucleicos, alcaloides, vitaminas, esteroides y muchos otros materiales biológicos son: cromatografía de adsorción, cromatografía de partición, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gel y cromatografía de afinidad. Los métodos difieren entre sí en el mecanismo principal que hace que las moléculas se retarden en su paso por la columna cromatográfica.

Destilación

La destilación se define simplemente como un proceso en el cual una mezcla líquida o vapor de dos o más sustancias se separa en fracciones de sus componentes con la pureza deseada, mediante la aplicación y remoción de calor. En la figura 30 se muestra una columna de destilación típica.

Evaporación

La evaporación es la remoción de una porción de solvente mediante la ebullición de la solución. Sólo las fracciones líquidas

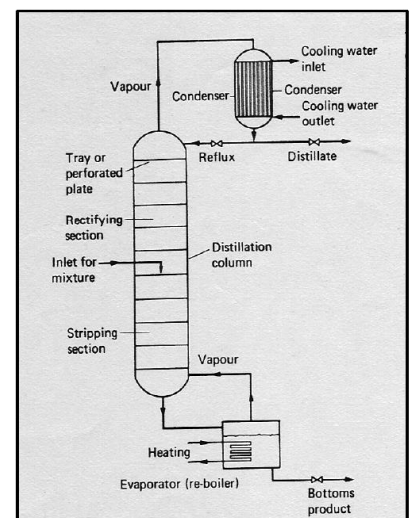


Figura 30 Componentes básicos de una columna de destilación

se evaporan, mientras que los sólidos se mantienen. Por evaporación se logra incrementar la concentración de una solución.

Cristalización

En la industria de bioprocesos los productos se obtienen con impurezas y para tener productos puros se necesita someterlos a operaciones unitarias como la destilación, la cristalización y la evaporación. La cristalización ocurre cuando un producto sólido se recupera de una solución con otro componente, lo que se logra mediante la sobre saturación de la solución aplicando uno o más de los tres métodos: enfriamiento, evaporación o enfriamiento adiabático. Si la solubilidad del soluto incrementa fuertemente con el aumento de la temperatura o sea cuando es una fuerte función de la temperatura, para que la solución saturada se haga sobresaturada simplemente por enfriamiento y reducción de la temperatura.

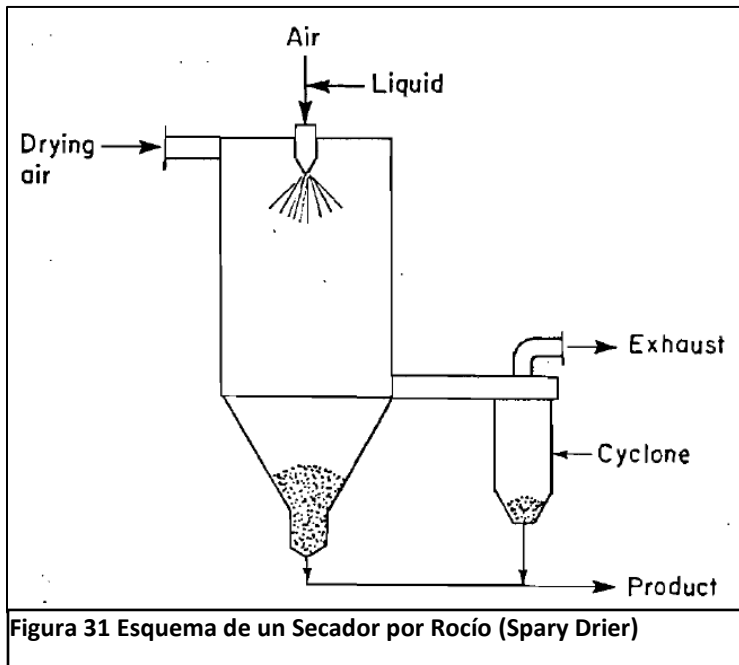
Para incrementar la capacidad de cristalización, en muchas ocasiones se utiliza el enfriamiento adiabático, que consiste en lograr la evaporación y el enfriamiento simultáneo sin la adición de calor. En ocasiones se necesita separar un sólido de la mezcla sólida. La purificación de la mezcla (separación de un componente) se lleva a cabo tratando la mezcla sólida con un solvente adecuado, de forma que se disuelva sólo el componente adecuado y luego cristalizar dicho componente. La solubilidad de los solutos juega un importante papel en la operación de cristalización [10].

Secado

El secado se refiere a la operación mediante la cual se extrae la humedad de una sustancia por métodos térmicos, lo que permite la remoción de cantidades relativamente pequeñas de agua del material sólido. El secado es uno de los métodos más antiguos para preservar los alimentos. Las sociedades primitivas practicaron el secado de la carne y del pescado al sol, antes del comienzo de la historia escrita.

Entre los métodos de secado se destaca el denominado Secado por Rocío (Spray Dryer), por ser un método para secar de forma rápida y continua soluciones, emulsiones y lodos.

En estos equipos los atomizadores centrífugos o de presión, así como los chorros de gas y líquido se utilizan para generar un fino rocío de gotas de solución las cuales se ponen en contacto continuo con aire caliente en grandes cámaras (Figura 31). La gran área superficial de las gotas y el pequeño tamaño de la gota aseguran una alta tasa de evaporación de manera que el secado se lleva a cabo en pocos segundos. El flujo de aire es generalmente ciclónico y las dimensiones del secador deben ser tales que las gotas no alcancen las paredes hasta que no estén suficientemente secas, de manera de evitar que se peguen o quemen. Una cámara de



secado tiende a ser bastante grande y diámetros entre 1 y 10 metros son comunes. El polvo seco sedimenta en el fondo y se remueve neumática, mecánicamente o por una combinación de ambos métodos. Las ventajas del secado por rocío son: es una operación continua, el producto pulverizado no requiere de posterior reducción de tamaño y el rápido proceso de secado asegura una buena calidad del producto, especialmente para materiales muy sensibles al calor, aunque la relativamente baja eficiencia térmica es una limitación.

También están disponibles secadores por rocío asépticos. En esos equipos, todo el aire usado es esterilizado previamente por

filtración y tanto el secador como las cámaras de manipulación de sólidos trabajan con una presión ligeramente positiva. Las instalaciones pueden operar a prueba de fugas y son esterilizables. Los antibióticos como el sulfato de estreptomicina para inyección directa se pueden secar por este método. También se han secado exitosamente por rocío productos muy sensibles al calor como algunas enzimas y el suero de sangre. Los microorganismos pueden también ser secados al rocío para su preservación y para ser utilizados como proteína unicelular (SCP por sus siglas en inglés) [1].

5. Principios básicos de Escalado de Procesos Biotecnológicos

Problemas que surgen relacionados con el cambio de escala

En el escenario de la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías está presente siempre la problemática de cómo convertir en una estructura económica de producción los conocimientos logrados en el laboratorio, concatenándolos con otros conocimientos ya establecidos, para poder llegar de esa forma a una escala comercial de producción. En este proceso de cambio de escala surgen problemas que en muchas ocasiones son ignorados completa o parcialmente y esa ha sido la causa de no pocos fracasos. Estos problemas pueden ser agrupados en dos tipos fundamentales: los que se relacionan exclusivamente con la necesidad de manejar grandes volúmenes de material y aquellos en que la naturaleza misma del problema se ve afectada por el tamaño de la escala de operación [11].

En el primer caso se tienen los problemas relacionados con los sistemas de enfriamiento, calentamiento y tratamiento de residuales, los cuales se llevan a cabo con relativa facilidad a nivel de laboratorio y requieren generalmente de equipos costosos y complejos cuando se realizan en la escala industrial. También son de este tipo de problemas los relacionados con la

necesidad de utilizar diferentes materiales al paso a una escala mayor, como ocurre al emplear reactivos químicos comerciales en lugar de los de grado analítico o la utilización de recipientes metálicos en lugar de los de vidrio, lo que puede introducir problemas de contaminación.

Los problemas del segundo tipo surgen cuando los distintos parámetros del proceso se ven afectados de manera diferente por el tamaño de la unidad. Un ejemplo sencillo puede ser el efecto que sobre la superficie específica de un recipiente tiene el cambio de escala. Una serie de recipientes de proporciones geoméricamente similares, pero de diferentes volúmenes, tienen un volumen que es proporcional al cubo del diámetro del recipiente, pero la superficie de la pared es proporcional al cuadrado del diámetro del recipiente, de manera que la superficie específica, que afecta a la transferencia de calor en las camisas refrigerantes, es proporcional al inverso del diámetro del recipiente.

Los microorganismos proporcionan otro ejemplo muy espectacular de este principio, ya que una de las características de su eficiencia como sistemas reaccionantes microscópicos es su gran superficie con respecto a su volumen. Una bacteria tiene un volumen de aproximadamente $5 \times 10^{-19} \text{ m}^3$ y una superficie de alrededor de 6×10^{-12} , por lo que la superficie específica es de alrededor de 3×10^6 , mientras que un m^3 de agua se puede encerrar en un tanque con una superficie de 6 m^2 , lo que hace una superficie específica de 6, o sea un millón de veces menor que la de las bacterias.

En los procesos químicos y bioquímicos se tiene que, durante la Investigación y Desarrollo de un nuevo producto, uno de los problemas que requiere una atención más estrecha y que en ocasiones llega a ser problemático, es el escalado del reactor. Es aceptado prácticamente por todos que el diseño de un reactor a escala comercial, el cual es el corazón de una planta química, no puede llevarse a cabo con un enfoque solamente teórico, por lo cual resulta imprescindible contar con datos de las reacciones involucradas obtenidos a nivel de laboratorio, banco o planta piloto.

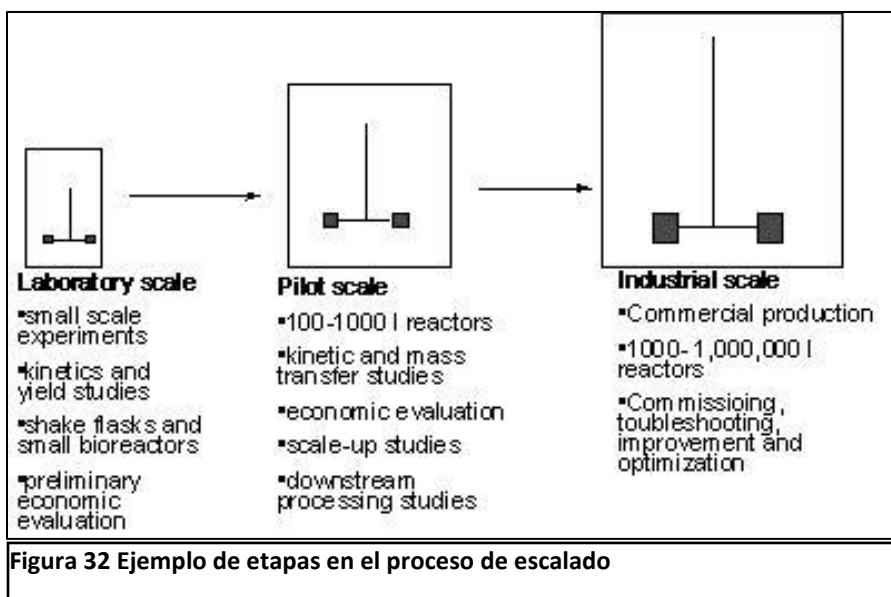
Un procedimiento de escalado satisfactorio puede requerir un enfoque empírico paso a paso, en el cual el tamaño del reactor se va incrementando paulatinamente, para poder conocer en detalle el efecto del cambio de escala en la velocidad y rendimiento de la reacción. Este procedimiento es largo y costoso y por ello se han desarrollado un número de métodos semi-empíricos alternativos para aliviar esta situación. Entre esos métodos está la aplicación del Principio de Semejanza, la modelación matemática y el uso de modelos a gran escala (mockups) y en muchas ocasiones los mejores resultados se logran con el uso combinado de los mismos. No obstante, todos esos métodos requieren de los datos cinéticos y termodinámicos básicos, los cuales deben de obtenerse de la literatura si están disponibles o de la experimentación [11].

Etapas a considerar en los trabajos de Investigación y Desarrollo (I+D).

El proceso de Investigación y Desarrollo puede considerarse dividido en 4 etapas, niveles o escalas: *Laboratorio*, *Banco*, *Piloto* e *Industrial*.

Esta división es convencional y por ello, como veremos más adelante, no son muy precisos los límites entre una escala y otra, ni tienen que considerarse siempre necesariamente todas las escalas, siendo bastante común, por ejemplo, obviar la escala semi-industrial. También hay casos, cuando el proceso es suficientemente conocido y sus características lo permiten, en que puede pasarse directamente de la escala de laboratorio a la escala industrial.

En su concepción más simple, el concepto de escalado se refiere al paso de una escala a otra, durante el proceso de desarrollo de un nuevo producto o tecnología. En ese caso se acostumbra a utilizar el término escalado ascendente (scale-up) al proceso que va desde la escala de laboratorio hasta la escala industrial y escalado descendente (scale-down) al proceso inverso, aunque conceptualmente son un mismo y único proceso de escalado y la definición del concepto escalado es un poco más compleja que el simple tránsito de una escala a otra.



En la práctica existen muchas definiciones del término escalado. Una de las clásicas lo limita al estudio de los problemas asociados a la transferencia de datos del laboratorio y la planta piloto a la producción industrial. Una definición más reciente plantea que el escalado hace uso de los datos del laboratorio y/o planta piloto, complementados con modelos a gran escala (mockups) y modelación matemática, para determinar

las dimensiones y el tamaño de una unidad industrial. Otra definición señala que éste consiste en el complejo de técnicas y metodologías que se utilizan para transferir un proceso desarrollado en una escala menor, a la escala de producción y esta última se ajusta bastante a la concepción actual y por ello tomaremos, como definición de escalado, una variante de la anterior:

Escalado es el proceso mediante el cual se logra la exitosa puesta en marcha y la operación económica de una unidad a escala comercial basándose, al menos en parte, en resultados de investigaciones realizada a una escala más pequeña.

De esta definición de escalado quedan excluidos los casos de diseño de unidades industriales realizados con procedimientos de cálculos tradicionales, para los cuales sólo se necesitan

los datos de las propiedades físico-químicas de las sustancias en proceso y las cantidades a procesar para obtener los valores de diseño requeridos.

Para que el concepto de escalado sea aplicado, es imprescindible que el diseño se realice sobre la base de investigaciones que se tengan que realizar con ese fin específico, a una escala inferior a la industrial, pero no se requiere que se transite por todas las etapas convencionales en que se dividen los procesos de I+ D.

El proceso completo, desde la escala de laboratorio hasta la comercial, pasando por trabajos de banco, planta piloto y escala semi-industrial, es largo y costoso y debe ser reducido en todo lo posible, con el fin de acortar el tiempo que media entre la concepción de un producto y su introducción en el mercado.

No existe duda alguna que es técnicamente posible transferir casi cualquier proceso desarrollado a nivel de laboratorio, directamente a la producción industrial a gran escala, si se dispone de suficiente tiempo y dinero, de forma que los diseñadores consideren factores de seguridad suficientemente amplios y que se esté dispuesto a un largo período de puesta en marcha, que permita adiestrar al personal y descubrir las diferentes causas de interrupciones y problemas de operación y afrontar los riesgos inevitables en la operación de nuevos procesos no suficientemente estudiados. Tampoco existe duda que los datos obtenidos en plantas de pequeña escala, correctamente diseñadas y operadas, son mucho más seguros para el diseño que los obtenidos directamente del laboratorio, con lo cual se pueden reducir considerablemente los factores de seguridad en el diseño y reducir apreciablemente el período y los riesgos de la puesta en marcha de las unidades comerciales, pero para obtener dichos datos se requiere a su vez de tiempo y empleo de recursos materiales y humanos.

Por todo lo anterior, en todos los casos resulta imprescindible el análisis detallado de las características del proceso que se pretende desarrollar y del nivel de conocimientos que se tiene sobre el mismo, para poder decidir las etapas que hay que acometer y planificarlas adecuadamente, de forma tal que se emplee el mínimo de recursos y se culmine en el menor tiempo posible.

Las técnicas de escalado se han desarrollado precisamente con el objetivo de reducir al mínimo indispensable ese tiempo de I+D y en ellas juegan un papel determinante las consideraciones técnico económicas.

Finalmente se debe considerar otro objetivo ligado al concepto de escalado y que es el estudio del comportamiento de una planta en producción existente, a partir de una unidad pequeña que reproduce, en lo fundamental, el funcionamiento de la unidad comercial. Este objetivo cae dentro de la esfera del estudio de los procesos, pero en principio no se diferencia del objetivo relacionado con el desarrollo de nuevos procesos, siendo la única diferencia práctica el hecho de que para el estudio de los procesos se requiere, casi siempre, solamente de la etapa equivalente a la planta piloto.

Crterios a considerar para los límites entre escalas

Para la definición de los límites entre una escala y otra existe una gran diversidad de criterios y en muchos casos se ha utilizado el volumen de los equipos como el criterio fundamental, particularmente en lo relacionado con la industria Biotecnológica, aunque en ese caso en realidad lo que se trata es de un significado particular del concepto de escalado, bastante más restringido que el concepto de escalado adoptado modernamente.

En la industria Biotecnológica resulta de particular significación el incremento paulatino del volumen en el que se desarrollan los microorganismos, de forma tal de asegurar un crecimiento adecuado, con las condiciones requeridas de asepsia y en un tiempo dado. Normalmente este incremento se regula de manera tal que cada nueva etapa se realice con una carga inicial (inóculo) entre un 5 y un 10 % del volumen efectivo total del equipo en cuestión y esto se efectúa siempre, con independencia de si el proceso es uno ya establecido o un proceso en desarrollo.

Este llamado escalado de las producciones Biotecnológicas no tiene realmente nada que ver con el escalado que se estudia en el presente texto, pero ha sido causa de confusión y una de los motivos por los cuales se utiliza mucho el volumen de los equipos como criterio de definición entre las etapas de los procesos de I+D.

También se han utilizado como criterios las relaciones entre las dimensiones lineales de los equipos (factores de escala geométricos), a partir de consideraciones de criterios de semejanza. En ocasiones se toma como valor aproximado que los factores de escala geométricos (lineales) deben estar en el rango de 5 a 15. De esa forma una columna de 2 m de diámetro puede ser escalada por una de 250 mm, lo que representa un factor de escala de 8. No obstante, en la práctica no es raro hallar factores tan bajos como 3 o tan altos como 100.

Una columna de 250 mm normalmente puede ser considerada demasiado grande para una instalación a escala pequeña, incluso para una planta piloto, a menos que se desee procesar una cantidad muy grande de producto y por ello se debe considerar un factor de escalado mayor, por ejemplo 13 y considerar entonces una columna de 150 mm, mucho más adecuada y aún dentro del rango recomendado. Si anteriormente se realizó el trabajo en la escala de banco con una columna de 25 mm de diámetro, los factores de escala empleados han sido 6 y 13, o sea se ha ido avanzando de un diámetro de 25 mm a 150 mm y finalmente a 2000 mm.

Por otra parte, cuando se escalan reactores la tendencia es a considerar el factor de escala por el volumen y esto lleva en ocasiones a considerar factores más elevados que el rango recomendado. Por ejemplo, si una reacción a escala de banco se ha realizado en un recipiente de 12 L y el tamaño final del reactor industrial se estima en unos 11500 L, se puede pensar que serán necesarias dos etapas intermedias, una de 100 L y otra de 1140 L, lo que daría factores de escala de 8, 12 y 10 respectivamente.

Sin embargo, se puede considerar mejor un valor intermedio de 400 L y en ese caso los factores de escala obtenidos, aunque superiores al rango recomendado, son también aceptables y esta opción constituye un buen compromiso, evitando tener que construir dos plantas piloto. Además,

si se considera la relación de escala con respecto a la dimensión lineal en lugar del volumen, lo que es realmente lo recomendado para el escalado, el cuadro cambia totalmente, ya que:

$$\left(\frac{400}{12}\right)^{\frac{1}{3}} = 3.2 \text{ y } \left(\frac{11500}{400}\right)^{\frac{1}{3}} = 3.1$$

o sea, factores de escala modestos, incluso por debajo del rango recomendado.

No obstante, en realidad el mejor criterio de definición de los límites entre las distintas escalas es la de los objetivos que se persiguen con cada una de ellas y los resultados que se esperan. Con ese criterio más amplio se pueden considerar la realización de etapas, por ejemplo, de banco y piloto, con equipos de pequeño volumen, normalmente considerados de laboratorio, en los casos en que el nivel de precisión y automatización sea tan elevado y la necesidad de obtener productos de muestra tan pequeña, que se puedan cubrir entonces los objetivos señalados para esas etapas, con un considerable ahorro económico.

Escala de laboratorio.

El laboratorio constituye la unidad primaria de investigación en la que quedan determinadas las metodicas de síntesis o procesamiento y se establecen las condiciones bajo las cuales se obtienen los mejores resultados. El laboratorio confirma o rechaza las hipótesis obtenidas del conocimiento previo y de la literatura y se obtienen datos que contribuyen a enriquecer la información sistematizada, que constituye la base para el trabajo a escala de banco y/o planta piloto. Además, se obtiene información para la realización de evaluaciones económicas preliminares y se determinan diversas propiedades físico-químicas, necesarias para los cálculos ingenieriles y la formulación y comprobación de modelos matemáticos.

Los objetivos principales de esta etapa son la obtención, recuperación y purificación de los productos de interés, así como el análisis y caracterización de los mismos.

En el caso de los procesos biotecnológicos, se tienen también como objetivos:

1. Seleccionar y evaluar cepas.
2. Optimizar el medio de cultivo y de otras variables experimentales y de proceso.
3. Obtener información en cortos plazos de tiempo a muy bajo costo.



Figura 33 Biorreactores a Escala de Laboratorio

Escala de banco

En esta etapa la investigación comienza a adquirir un carácter tecnológico y posee sus particularidades que la distinguen:

- Se orienta a la configuración de las unidades experimentales con características geométricas y operacionales similares a los equipos de planta piloto o industriales disponibles o recomendables, a diferencia de la etapa de laboratorio, donde el equipamiento utilizado difiere considerablemente del industrial.
- Conlleva un mayor nivel de instrumentación y automatización
- El trabajo experimental se orienta hacia el completamiento y precisión de la información de laboratorio.

Los estudios de banco constituyen un paso de gran importancia y pueden contribuir a reducir considerablemente los costos de la investigación y obviar, en algunos casos, la necesidad de los trabajos a escala piloto.



Figura 34 Biorreactor
Escala de Banco

Los objetivos principales de esta etapa son:

1. Revelar la esencia de los fenómenos que ocurren en los procesos.
2. Revelar los pasos controlantes o críticos en las operaciones.
3. Verificar hipótesis de modelos matemáticos.
4. Aportar información para cálculos y diseños de ingeniería.

En el caso de los procesos biotecnológicos se consideran también los siguientes objetivos:

1. Seleccionar el procedimiento de desarrollo de inóculos, esterilización del medio, aireación, agitación y operaciones de purificación.
2. Ajustar variables como razón de transferencia de oxígeno, evolución de dióxido de carbono, producción de biomasa, biosíntesis de metabolitos y efectos del pH.
3. Estudiar el régimen de alimentación continua o incrementada.
4. Seleccionar alternativas de control e instrumentación.
5. Hacer la evaluación económica preliminar y el estimado de viabilidad del proceso.

Esta etapa permite un enfoque científico a relativo bajo costo.

Escala piloto

Los estudios de escala piloto resultan de especial importancia para el cambio de escala en muchos procesos, pero poseen un alto costo y la decisión de su realización debe estar subordinada a un conjunto de factores entre los cuales se destacan:

- Tipo de proceso
- Nivel de información disponible
- Tamaño propuesto para la unidad industrial

La planta piloto debe montarse y operarse de manera que permita satisfacer al menos uno de los siguientes objetivos principales:

1. Evaluar la factibilidad de un proceso tecnológico.
2. Obtener la información para el diseño de una planta comercial.
3. Obtener cantidades de productos con fines de ensayo o promoción.

Además de estos, en el caso de la Síntesis Orgánica se tienen los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener *know-how* del proceso.
2. Corroborar teorías sobre mecanismos de los procesos.
3. Obtener información para el tratamiento de residuales.
4. Ensayar materiales de construcción.
5. Probar métodos de análisis de procesos y control de calidad.
6. Estudiar sistemas para el control de procesos.
7. Evaluar nuevos equipos y sistemas tecnológicos.
8. Entrenar al personal.

En el caso de los procesos biotecnológicos, se tienen los siguientes objetivos específicos:

1. Confirmar los datos obtenidos a nivel de banco y verificar los criterios de escalado.
2. Seleccionar las estrategias de esterilización del medio y de concentración y purificación de productos.
3. Obtener cantidades de productos para pruebas de caracterización, toxicológicas, promoción de mercado y verificación de la viabilidad del proceso.
4. Ofrecer una información de validación a un costo relativamente alto.



Figura 35 Biorreactor de Escala Piloto

Escala industrial

Muchas veces esta escala no se considera una parte del proceso de investigación y desarrollo y esto constituye un error conceptual, con fuertes implicaciones de índole práctica. Realmente la industria constituye, no sólo una prueba de validación de las experiencias precedentes, sino que enriquece la información ingenieril disponible y los modelos matemáticos formulados y brinda información de gran valor para el perfeccionamiento de equipos y para la optimización del propio proceso productivo.

Además, en la mayoría de los casos las instalaciones a escala de banco y/o piloto se diseñan a partir de un scale-down de la instalación industrial existente o supuesta, en base a la experiencia acumulada con la operación de otras industrias. Por todo lo anterior, la escala industrial debe ser considerada etapa importante en el conjunto de las tareas de I+D.

Ejemplo de escalado de un proceso biotecnológico

Se tomará como ejemplo la producción de un nuevo producto recombinante como insulina, hormona de crecimiento o interferón (Figura 36):

Escala de Laboratorio: Comienza con la manipulación genética del organismo hospedero en la que se clona un gene de procedencia animal en la bacteria *Escherichia coli* (Figura 36, Etapas 1 a 11). En esas etapas se utilizan como herramientas placas Petri, micropipetas, micro centrifugas, nano o micro cantidades de enzimas de restricción y gel de electroforesis para el fraccionamiento del ADN y la proteína. En términos de la Ingeniería de Bioprocesos, los parámetros de mayor importancia a definir en estas etapas son la estabilidad de las cepas construidas y el nivel de expresión del producto deseado.

En la Etapa 12 (Figura 36) se miden las características de crecimiento y producción de las células clonadas en función del ambiente del cultivo. Para eso se realizan los cultivos a pequeña escala mediante el empleo de frascos Erlenmeyer de 250 mL a un litro de capacidad, en agitadores rotatorios. Se determina la composición del medio, pH, temperatura y otras condiciones ambientales que permiten el crecimiento óptimo y productividad deseada. Se utilizan parámetros calculados como la tasa de crecimiento celular, productividad específica y rendimiento de producto para describir el rendimiento del microorganismo. Desde esta escala se inicia la aplicación de la modelación matemática y simulación mediante el empleo de simuladores numéricos y gráficos como Stella y Madonna.

Escala de banco: En la Etapa 13 (Figura 36) empieza el escalado, utilizando biorreactores de 1 a 2 litros equipados con instrumentos para medir y ajustar temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, velocidad de agitación y otras variables de proceso. Con el empleo de los biorreactores, el cultivo se puede monitorear más estrechamente que en los frascos agitados, por lo que en esta etapa se puede lograr un mejor control sobre el proceso, lo que permite recopilar información sobre los requerimientos de oxígeno de las células, su sensibilidad al esfuerzo cortante, tendencia a la formación de espuma y otros parámetros. Al ser la viabilidad del proceso como empresa comercial de fundamental interés, la información obtenida sobre la

actividad de las células se utilizará en los cálculos posteriores para determinar la factibilidad económica del proceso. Se utiliza ampliamente la modelación y simulación matemática, con el empleo de simuladores numéricos y gráficos como *Stella y Madonna*.

Escaleta Piloto: En la Etapa 14 (Figura 36) se utilizan biorreactores con capacidad entre 100 y 1000 litros, construidos a partir de la información obtenida con el biorreactor de escala de banco (1 a 2 litros). El cambio de tamaño del equipo parece algo trivial, sin embargo, como se explicó en los epígrafes anteriores, aunque se mantenga constante la geometría del biorreactor y el método de aireación y diseño del impelente de mezclado sean similares en la escala pequeña y en los biorreactores piloto, el efecto en la actividad de las células puede ser grande.

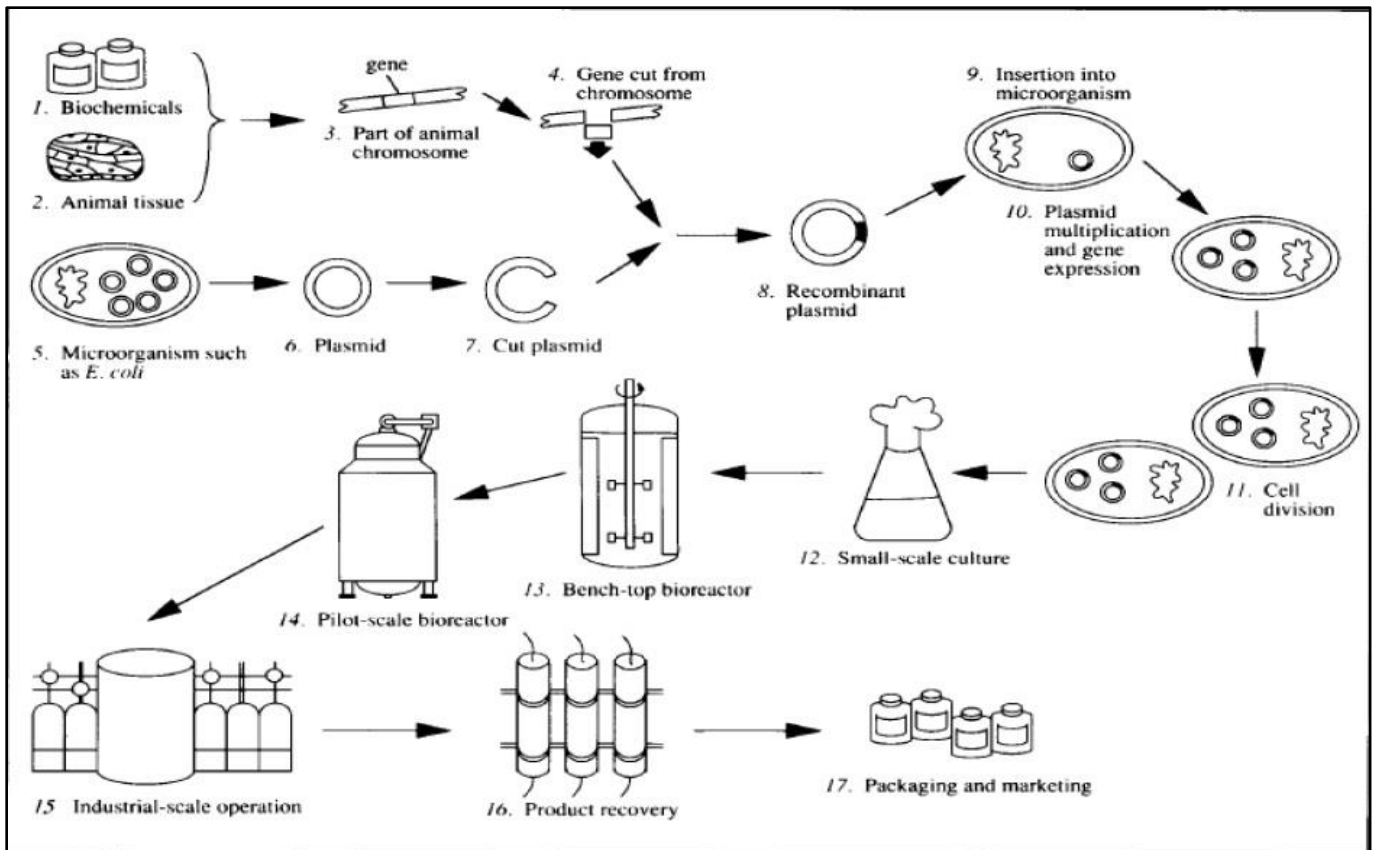


Figura 36 Proceso Completo de Escalado de un Bioproducto

La pérdida de productividad que sigue al escalamiento de la capacidad de producción puede ser o no recuperada, por lo cual frecuentemente a partir de los resultados de la Escala Piloto se necesita evaluar nuevamente las proyecciones económicas. Por ese motivo las evaluaciones económicas de un bioproceso solo resultan válidas cuando se realizan con los resultados de la Escala Piloto. En esta Escala se comienza la aplicación de los Simuladores Comerciales de Procesos como el *Superpro Designer*.

Escala industrial: Esta parte del proceso de escalado y la Escala Piloto son las que caen más claramente en el territorio de la Ingeniería de los Bioprocesos. En la Etapa 15 (Figura 36) se diseñan tanto el Biorreactor como las actividades de servicios auxiliares, lo que incluye; suministro de aire, equipamiento para la esterilización, generación de vapor y líneas de distribución, instalaciones para la preparación y esterilización del medio, suministro de agua de enfriamiento y redes de control de proceso. Además, para asegurar que la biorreacción se lleve a cabo asépticamente, hay que prestar especial atención a los requerimientos de seguridad y contención.

En la Etapa 16 (Figura 36) se diseña el Proceso de Recuperación de Productos (Procesamiento Downstream), la que se lleva a cabo en varias etapas después que el producto abandona el Biorreactor, hasta obtener el producto final con la pureza requerida. El proceso de purificación es frecuentemente muy difícil y caro. Para algunos productos derivados de ADN recombinante, el costo de las etapas de purificación es el 80 – 90 % del costo total de producción. El procesamiento de los productos depende mucho de la naturaleza del producto y del caldo que sale del biorreactor y hay que emplear métodos físicos, químicos o biológicos. En el diseño de estos sistemas complejos de purificación juegan un rol importante los químicos, bioquímicos, ingenieros químicos y químicos industriales, los que trabajarán de conjunto con los biotecnólogos.

En la Etapa 17 (Figura 36), previo al diseño del proceso de empaquetado y comercialización de los productos, se realizan las pruebas clínicas necesarias para demostrar la eficacia de los productos, sobre todo cuando se trata de nuevos productos farmacéuticos tales como la hormona de crecimiento humana o la insulina recombinante. Primero se realizan pruebas con animales y después con humanos y el producto podrá ser liberado solamente después de realizado todos los ensayos necesarios y de haber establecido la seguridad del producto. Cuando los productos son alimentos hay que realizar otros tipos de pruebas. Pero en todos los casos hay que cumplir con los requerimientos estándar para la fabricación, lo que es especialmente importante en el caso de los productos recombinantes, en los cuales se requiere un mayor número de medidas de seguridad y precaución.

En la Escala Industrial se hace un uso intensivo de los Simuladores Comerciales de Proceso como el **Superpro Designer**.

Referencias Bibliográficas de los Artículos

- [1] Yusuf Chisti and Murray Moo-Young, "Fermentation Technology, Bioprocessing, Scale-up and Manufacture," in *Biotechnology: The Science and the Business*, Segunda Edición., CRC Press, New York, p. 1999.
- [2] Yusuf Chisti and Murray Moo-Young, "Biochemical Engineering in Biotechnology," *Pure Appl Chern*, vol. 66, no. 1, pp. 117–136, 1994.
- [3] T. Al Seadi, D. Rutz, H. Prassl, M. Köttner, T. Finsterwalder, S. Volk, and R. Janssen, *Biogas Handbook*. Esbjerg: University of Southern Denmark Esbjerg, 2008.
- [4] Rodolfo Ertola, Osvaldo Yntorno, and Carlos Mignone, *Microbiología Industrial*. Organización de Estados Americanos.
- [5] Michael C. Flickinger and Stephen W. Drew, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. Volumes 1 - 5*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999.
- [6] Ghasem D. Najafpour, *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science Ltd., 2007.
- [7] Red Universitaria de Ambiente y Salud, "Plantas de Bioetanol a partir de maíz transgénico. Como funcionan, como contaminan y sus efectos en la salud," Red Universitaria de Ambiente y Salud, Córdoba, Argentina, Estudio Ambiental, Agosto 2013.
- [8] Francisco G. Bolívar Zapata, *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*, Segunda. México, D. F.: El Colegio Nacional, 2007.
- [9] Yusuf Chisti and Murray Moo-Young, "Bioreactors," in *Encyclopedia of Physical Science and Technology, Eighteen-Volume Set, Third Edition*, 3era. Edición., 18 vols., London: Elsevier Science Ltd., 1993, pp. 247–271.
- [10] G. M. Madhu, "Bioprocess Principles," in *Bioprocess Principles and Calculations Lecture Notes*, Karnataka, India: Visvesvaraya Technological University (VTU), 2013, p. 20.
- [11] Roberto A. González, *Principios básicos de escalado*. La Habana: Editorial Universitaria, 2000.