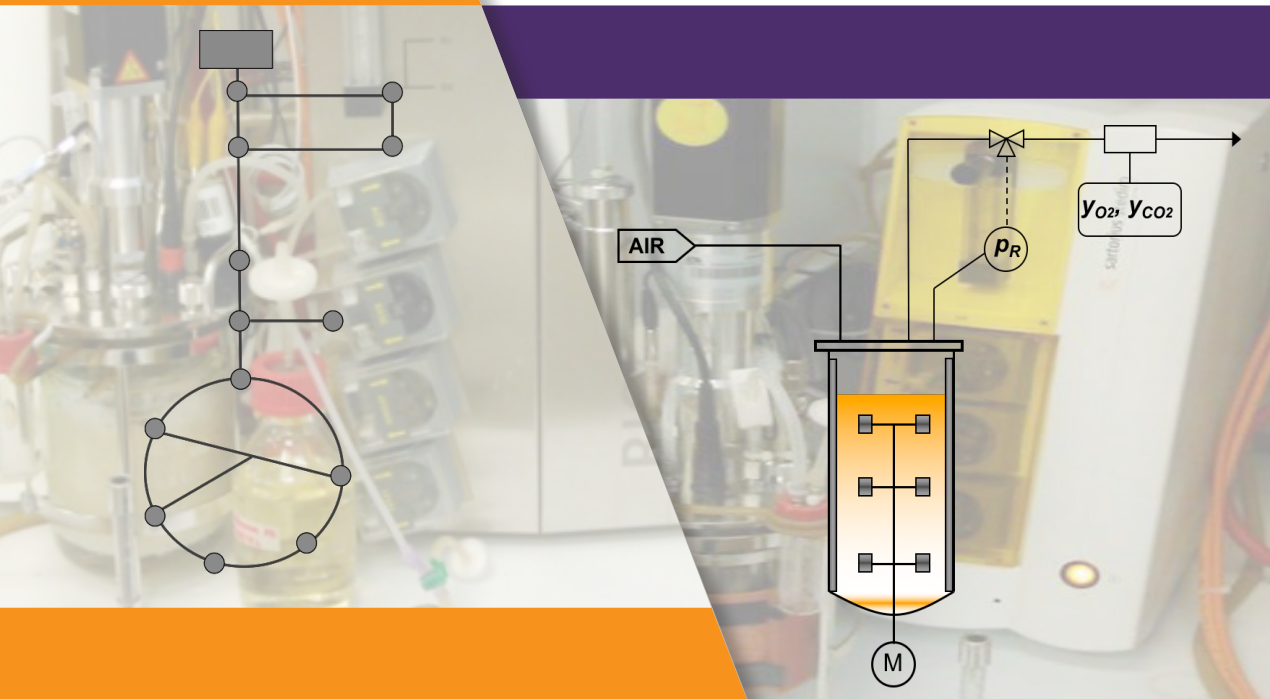


Problemas de ingeniería biológica

Roberto Olivares Hernández
Rodolfo Quintero Ramírez



Problemas de ingeniería biológica



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa

Problemas de ingeniería biológica / Roberto Olivares Hernández, Rodolfo Quintero Ramírez
Mendoza. – Ciudad de México : UAM, Unidad Cuajimalpa, 2018.

436 p. : il. col., diagrs., gráficas, tablas ; 24 cm.

ISBN: 978-607-28-1179-9

1. Bioingeniería 2. Biotecnología 3. Biología

I. Olivares Hernández, Roberto, coaut. II. Quintero Ramírez, Rodolfo, coaut.

Dewey: 660.6 O45

LC: TA164 O45

Esta obra fue dictaminada positivamente por pares académicos mediante el sistema doble ciego y evaluada para su publicación por el Consejo Editorial de la UAM Unidad Cuajimalpa.

© 2018 Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa

Avenida Vasco de Quiroga 4871

Col. Santa Fe Cuajimalpa, delegación Cuajimalpa de Morelos

C. P. 05348, Ciudad de México (Tel: 5814 6500)

www.cua.uam.mx

ISBN: 978-607-28-1179-9

Primera edición: 2018

Diseño editorial y portada: Literatura y Alternativas en Servicios Editoriales S. C.

Avenida Universidad 1815-c, Depto. 205, Colonia Oxtopulco,

C. P. 04318, Delegación Coyoacán, Ciudad de México.

Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida o transmitida mediante ningún sistema o método electrónico o mecánico sin el consentimiento por escrito de los titulares de los derechos.

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico

ROBERTO OLIVARES HERNÁNDEZ Y RODOLFO QUINTERO RAMÍREZ

Problemas de ingeniería biológica



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Eduardo Peñalosa Castro
Rector General

Dr. José Antonio De los Reyes Heredia
Secretario General

Dr. Rodolfo Suárez Molnar
Rector de la Unidad Cuajimalpa

Dr. Álvaro Peláez Cedrés
Secretario de la Unidad Cuajimalpa

Mtro. Octavio Mercado González
Director de la División de Ciencias de la Comunicación y Diseño

Dr. Raúl Roydeen García Aguilar
Secretario Académico de la División de Ciencias de la Comunicación y Diseño

Dr. A. Mauricio Sales Cruz
Director de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería

Dr. José Javier Valencia López
Secretario Académico de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería

Dr. Roger Mario Barbosa Cruz
Director de la División de Ciencias Sociales y Humanidades

Dr. Jorge Lionel Galindo Monteagudo
Secretario Académico de la División de Ciencias Sociales y Humanidades

Índice

PRÓLOGO.....	13
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	15
Surgimiento de la ingeniería biológica.....	15
La industrialización de la biología	16
Oferta educativa de la ingeniería biológica en México.....	19
Literatura disponible para el estudio de la ingeniería biológica	22
BIBLIOGRAFÍA	27
CAPÍTULO 2	
CAMPOS LABORALES DEL INGENIERO BIÓLOGO	31
Introducción	31
Industria farmacéutica y biofarmacéuticos.....	32
Sector alimentos.....	33
Ambiente	34
Producción de químicos	35
Biorrefinerías	37
BIBLIOGRAFÍA	39
CAPÍTULO 3	
BIOPROCESOS	41
Introducción	41
Características de la materia prima útil para los bioprocesos.....	45
Agentes biológicos	49
Problema 3.1	
Estequiometría del crecimiento de un microorganismo en condiciones aerobias	53
Introducción	53
Problema 3.2	
Formulación de un medio de cultivo	55
Introducción	55
Problema	56
Procedimiento.....	57
Problema 3.3	
Balance de materia en un proceso de producción de café descafeinado.....	64
Introducción	64
Contexto de la producción del café descafeinado.....	65
Enunciado del problema	66
Paso 1. Descripción y clasificación del proceso.....	66
Paso 2. Diagrama del proceso	67
Paso 3. Análisis de grados de libertad (AGL)	68
Paso 4 y 5. Planteamiento, simplificación y resolución de la(s) ecuación(es) de balance(s)	70

Paso 6. Resultados	77
Factores de escalamiento	78
Problema 3.4	
Balance de energía en un proceso de producción de café descafeinado	79
Introducción	79
Enunciado del problema	79
Paso 1. Descripción y clasificación del proceso.....	80
Paso 2. Diagrama del proceso	80
Paso 3. Análisis de grados de libertad (AGL)	80
Paso 4 y 5. Planteamiento, simplificación y resolución de la(s) ecuación(es) de balance(s)	82
Problema 3.5	
Balance de materia y energía en un reactor de charolas para fermentación en medio sólido.....	91
Introducción	91
Objetivo del problema.....	93
Metodología.....	93
Estimación de las propiedades físicas y termodinámicas del lecho de fermentación	95
Balance estequiométrico.....	97
Balance de materia (agua) en un reactor de charolas para FMS	99
Balances de energía (calor) en un reactor de charolas para FMS.....	100
Nomenclatura.....	102
Problema 3.6	
Cálculos en intercambiadores de calor	103
Introducción	103
Problema propuesto.....	105
Solución del problema.....	105
Solución empleando el método de (MLDT)	106
Problema 3.7	
Transferencia de masa gas-líquido acoplada a consumo de oxígeno microbiano.....	109
Introducción	109
Procesos microbianos aerobios	109
Obtención de las ecuaciones para representar la transferencia de oxígeno de una burbuja a un medio de cultivo líquido	110
Acoplamiento de la transferencia de oxígeno con la producción de biomasa.....	115
Problema 3.8	
Cultivo continuo.....	118
Introducción	118
Solución	118
Problema 3.9	
Producción de un bioinsecticida (Bt).....	121
Introducción	121
Problema. Escalamiento de una tecnología de fermentación	122
Escalamiento de las condiciones de operación del fermentador	125
Problema 3.10	
Tratamiento anaerobio para la depuración de agua y producción de biogás.....	128
a.1. Rendimiento de eliminación de materia orgánica	129
a.2. DQO a la salida del digestor	130
b. Volumen del digestor anaerobio	130
c. Cálculo del flujo másico y volumétrico de lodo anaerobio que hay que purgar.....	130
d. Caudal y tasa de recirculación de fango anaerobio al digestor.....	131

Problemas 3.11	
Sistema de lodos activados para la depuración de agua y producción de biogás.....	133
Solución	134
Cálculos	134
Problemas 3.12	
Diseño de un fotobiorreactor de lagunaje de alta carga (HRAP, High rate algal pond, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de agua residual.	137
Marco teórico	137
Definiciones previas	138
Protocolo de diseño	140
Enunciado del problema	141
Datos para diseño	142
Solución	142
a) Determinar las dimensiones del HRAP (Área, profundidad, longitud, anchura, número de canales)	142
b) Determinar el tiempo de residencia del agua residual mínimo (θ) para el tratamiento del agua residual	143
c) Determinar la capacidad de oxigenación del HRAP ($\text{g}/\text{m}^2/\text{d}^1$) y el área necesaria cubrir la demanda de O_2	144
d) Estimar las dimensiones del espacio donde encajaría Área = L W N°; asumiendo un L/W= 40:1. Se calculará N° la pérdida de carga del sistema (fricción + cambios de dirección) < 3 pulgadas (donde 3 pulgadas equivale a 0.25 pies) ...	144
Problema 3.13	
Estimación de costos del uso de una planta piloto de bioprocesos	145
Introducción	145
Problema	146
Solución	146
Proceso de producción	148
Solución	148
Problema 3.14	
Proceso para generar una innovación tecnológica con fines de comercialización.....	151
Introducción	151
Problema	153
1. Antecedentes clínicos	154
2. Estudio de mercado	155
3. Estudio de patentabilidad	156
Problema 3.15	
Estrategia para dar valor agregado a residuos de cítricos en una empresa.....	157
1. Introducción	157
2. Planteamiento del problema	158
3. Desarrollo de la solución	158
3.1. Levantamiento de información de la empresa y recomendaciones	158
3.2. Colecta de información bibliográfica	160
3.3. Aplicaciones comerciales de residuos cítricos en el mundo	164
3.4. Desarrollos del uso de residuos cítricos en México	168
4. Número de referencias y patentes relacionadas.....	169
5. Propuesta.....	170
BIBLIOGRAFÍA	171

CAPÍTULO 4	
BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS	179
Introducción general.....	179
Problema 4.1	
Representación de crecimiento de microalgas y aspectos nutricionales.....	180
Marco teórico	180
Enunciado del problema	181
Resuelva cada uno de los siguientes incisos.....	182
Solución	182
Problema 4.2	
Aspectos cinéticos en el cultivo de microalgas: influencia de temperatura, irradiancia y pH.	
Determinación de las condiciones óptimas de cultivo y obtención de parámetros cinéticos.....	190
Marco Teórico	190
Enunciado del problema	191
Con base en la información presentada en las tablas, responda cada uno de los incisos....	191
Solución	193
Problema 4.3	
Caracterización de un cultivo microalgal y evaluación del desempeño de un fotobiorreactor de placas planas para la captura de CO ₂ y producción de lípidos.....	
de placas planas para la captura de CO ₂ y producción de lípidos.....	199
Marco teórico.....	199
Enunciado del problema	202
Solución	204
Problema 4.4	
Obtención de biocombustibles a partir de biomasa microalgal.	
Caso de estudio producción de biogás.....	208
Marco teórico	208
Enunciado del problema	209
Actividades.....	210
Solución (para detalles ver la hoja Excel titulada Problema 3).....	211
Problema 4.5	
Diseño de un sistema a base de microalgas-bacterias para depuración de biogás	216
Marco teórico	216
Enunciado del problema	218
Calcular.....	219
Solución	219
Nomenclatura	227
BIBLIOGRAFÍA	229
Lecturas recomendadas.....	230

CAPÍTULO 5

PROCESOS BIOCATALÍTICOS.....	231
Enzimas, actores principales de los procesos biocatalíticos.....	231
Cinética química y enzimática de las reacciones.....	233
Un poco de historia sobre la cinética enzimática.....	233
Principios de cinética química.....	235
Cinéticas de primer orden.....	235
Cinéticas de segundo orden.....	238
Cinética enzimática.....	241
Desarrollo de la ecuación de Michaelis-Menten.....	241
La aproximación del equilibrio de Michaelis-Menten.....	243
La aproximación del estado estacionario de Briggs y Haldane.....	245
Significado físico de la K_M	247
Constante catalítica, número de recambio y eficiencia catalítica.....	249
Estimación de los parámetros cinéticos.....	250
Biocatalizadores.....	253
Procesos biocatalíticos.....	254
Clasificación de los procesos biocatalíticos.....	259
Etapas de un proceso biocatalítico.....	260
Caracterización de un proceso biocatalítico.....	266
Rendimiento de producto.....	266
Productividad del biocatalizador.....	269
Estabilidad del biocatalizador.....	270
Productividad del reactor.....	272
Futuro y perspectivas de los procesos biocatalíticos.....	273
Problema 5.1	
Cinética enzimática y biocatálisis	
Ejemplo de aplicación de lacasas en la industria textil.....	275
Objetivo del problema.....	277
Metodología.....	278
Solución.....	279
Problema 5.2	
Uso de enzimas alimentarias.....	285
Planteamiento del problema.....	285
Respuesta.....	285
Solución.....	286
Solución.....	287
Nomenclatura.....	289
BIBLIOGRAFÍA.....	291

CAPÍTULO 6

INGENIERÍA BIOMÉDICA Y SUS APLICACIONES	297
Introducción	297
Fisiología humana.....	298
Aplicaciones de la ingeniería biomédica	301
Modelado fisiológico.....	301
Biomecánica.....	305
Procesamiento de imágenes	306
Bioinstrumentación.....	308
Biomateriales	310
Ingeniería biomolecular.....	312
Conclusiones.....	316
Problema 6.1	
Diseño de un experimento para medir la permeabilidad de un andamio para su aplicación en cultivos celulares.....	317
Introducción	317
Contexto del problema.....	318
Problema	318
Definición de metodología para medir la permeabilidad	319
Interpretación de los resultados y conclusión	328
Problema 6.2	
Cuantificación de daño tisular y su análisis estadístico	329
Antecedentes.....	329
Los tejidos y las técnicas para analizarlos.....	329
Lesión por isquemia-reperusión	330
Solución	331
Protocolo experimental	332
Análisis estadístico	332
Conclusiones.....	337
BIBLIOGRAFÍA	338
Lecturas recomendadas.....	340

CAPÍTULO 7

TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN DE BIOMOLÉCULAS	341
La química de la vida: ¿qué son las biomoléculas?.....	341
Proteínas.....	342
Carbohidratos.....	343
Lípidos	344
Ácidos nucleicos.....	345
Aplicación tecnológica de las biomoléculas: ¿qué es la bionanotecnología?	346
Caracterización de biomoléculas	349
Movimiento browniano y dispersión de luz.....	349
Difusión y ósmosis.....	351
Electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	356
Problema 7.1	
Transporte pasivo en membranas	358
Introducción	358

Planteamiento del problema	359
Caso 1. Estudio de la difusión simple en la preparación de una infusión de jamaica en agua...	359
Caso 2. Ósmosis.....	360
Desarrollo de la solución	361
Caso 1. Estudio de la difusión simple al preparar una infusión de jamaica en agua.....	361
Caso 2. Ósmosis.....	362
Nomenclatura.....	366
Problema 7.2	
Estrategia para identificar una proteína extracelular de bajo peso molecular con actividad interfacial, producida por hongos filamentosos.....	367
Introducción	367
Problema 7.3	
Aplicación tecnológica de partículas biopoliméricas.....	374
Planteamiento del problema	374
Respuesta.....	375
Planteamiento del problema	375
Respuesta.....	376
Formulación de la idea.....	376
Plan.....	377
Desarrollo técnico y de la estrategia de mercadotecnia.....	377
Prueba de mercado	377
Comercialización	377
BIBLIOGRAFÍA	378
Lecturas recomendadas.....	379
CAPÍTULO 8	
INGENIERÍA METABÓLICA.....	381
Introducción.....	381
Desarrollo sustentable de productos y materias primas	382
Ingeniería metabólica	383
Problema 8.1	
Generación de una cepa de <i>Escherichia coli</i> para la producción de L-tirosina	387
Introducción	387
Objetivo del problema.....	389
Metodología.....	389
Problema 8.2	
Estrategia de clonación in silico para la producción de proteína recombinante en <i>Escherichia coli</i>	395
Contexto del problema.....	395
Requerimientos	395
Planteamiento del problema	396
Respuestas al problema	397
Problema 8.3	
Cálculo de velocidades, tasas específicas y rendimientos.....	406
Introducción	406
Cálculo de velocidades de consumo y producción.....	407
Cálculo de tasas específicas.....	410
Cálculo de tasa específica volumétrica.....	412
Cálculo de rendimientos.....	413

Problema 8.4	
Tasas específicas como parámetros de comparación entre experimentos a distintas escalas.....	416
Problema 8.5	
Cálculo de rendimiento máximo teórico en una red metabólica.....	418
Introducción	418
BIBLIOGRAFÍA	421
SEMBLANZAS.....	427
Profesores.....	427
Alumnos	435

Prólogo

En la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa (UAM-C), la Licenciatura en Ingeniería Biológica ofrece un programa de estudios de carácter novedoso en México como resultado de la naturaleza de la planta académica que está al frente. En los profesores de la carrera confluye el conocimiento de distintas disciplinas, tales como ingeniería bioquímica, ingeniería de procesos, biotecnología e ingeniería química. Por lo tanto, este libro se diseñó para compilar los conocimientos, habilidades y visión técnico-científica de los miembros del Departamento de Procesos y Tecnología que logran enriquecer el perfil del ingeniero biológico en México. Más aún, en este libro están incluidas las aportaciones de gente especialista en su campo, adscrita a instituciones como la Universidad Autónoma Metropolitana unidades Lerma e Iztapalapa, la Universidad de Valladolid y el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El objetivo de este libro consiste en que el estudiante de ingeniería biológica de la UAM-C comprenda los temas de su especialidad y aplique los conocimientos en la solución de problemas de la vida real. Este objetivo se logra por medio de poner a disposición del alumno problemas resueltos que se originan de la experiencia académica y de investigación de los autores.

Este libro está dirigido a los alumnos que cursen las Unidades de Enseñanza-Aprendizaje de las áreas de formación básica y formación profesional; áreas que son parte del currículo de las licenciaturas en la UAM-C. Sin embargo, consideramos que cualquier estudiante interesado en adquirir conocimientos de ingeniería y de ciencias de la vida dispondrá de un material de gran valor para su formación.

Capítulo 1

Introducción

Surgimiento de la ingeniería biológica

La ingeniería biológica, o bioingeniería, es una disciplina de ingeniería que se fundamenta en los principios de ingeniería y biología. Su origen data de inicios del siglo xx, al instituirse la ingeniería en agricultura; la cual fue considerada en su momento la ingeniería de la biología. Décadas después, la ingeniería en agricultura comenzó a interactuar con otras disciplinas de ingeniería como: ingeniería biomédica e ingeniería bioquímica. Al fundamentarse en la biología, también existen interacciones con las áreas de las ciencias de la vida, tales como: microbiología, ingeniería genética, bioquímica, genómica y biología molecular, entre otras. Para entender el alcance y definición de la ingeniería biológica es necesario citar distintas definiciones de ingeniería biológica por distintos institutos y asociaciones (Johnson, 2006). Por ejemplo, de acuerdo con el Instituto de Ingeniería Biológica (IBE, por sus siglas en inglés) una definición de ingeniería biológica es la siguiente: “Es una disciplina de ingeniería, fundamentada en la biología que integra a las ciencias de la vida con esta, para el desarrollo y aplicación de conceptos fundamentales de los sistemas biológicos, comprendiendo desde las moléculas hasta los ecosistemas” (IBE, 2017).

Otra definición, es la del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés): *La bioingeniería integra: la física, química, matemáticas, ciencias de la computación con los principios de ingeniería para el estudio de la biología, la medicina y la salud. Se basa en conceptos fundamentales, creando conocimiento desde la perspectiva molecular hasta el nivel de órganos y sistemas, también desarrolla innovación en materiales, procesos, implantes, utensilios; con aproximaciones informáticas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, en la rehabilitación de los pacientes para el mejoramiento de la salud.*

Una tercera definición es la que está escrita en el Plan de Estudios de la licenciatura en ingeniería biológica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa: “La ingeniería biológica integra los conocimientos de los sistemas biológicos, desde el nivel molecular y celular al sistémico, y los principios de la ingeniería para desarrollar procesos y productos para el beneficio de la sociedad”.

La intención de presentar estas tres definiciones es la de señalar que la ingeniería biológica se fundamenta en los principios de la biología e integra los aspectos cuantitativos y de aplicación que son parte de las disciplinas de ingeniería. También, en estas definiciones se puede leer que existen componentes de aplicación en campos como la medicina y la salud. Por lo tanto, el ingeniero biólogo estará habilitado con fundamentos técnicos y científicos para tener la capacidad de impactar en una gran variedad de campos como: alimentos, medicina, ciencias biomédicas, ingeniería de procesos, biotecnología y agricultura, entre otros, sobre todo aprovechando su capacidad para manipular agentes biológicos (proteínas, enzimas, microorganismos, células, animales, vegetales o individuos) como un componente central en el diseño de los bioprocesos y servicios. Es necesario resaltar que el ingeniero biólogo es un profesional con capacidad para innovar en el desarrollo de las ciencias de la ingeniería y biotecnología; esta última se entiende como un área multidisciplinaria cuyo objetivo es desarrollar toda aquella aplicación tecnológica que involucre sistemas biológicos o seres vivos y sus derivados para la creación de productos y procesos*.

En este libro, se compilan distintos problemas que fueron resueltos con base en las habilidades y conocimientos de los autores. Estos problemas tienen un carácter integral, ya que compilan el conocimiento que un ingeniero biólogo adquiere como parte de su formación, además de que le permiten conocer las distintas aplicaciones de la ingeniería. Se puede considerar que se tiene una perspectiva original de lo que significa la ingeniería biológica en México.

La industrialización de la biología

Una de las primeras compañías fundadas en el conocimiento de las ciencias biológicas, la tecnología y la ingeniería fue Genentech en 1976. Esta utilizó la tecnología de ADN recombinante patentada por Cohen & Boyer para poder generar y comercializar los primeros productos con base biotecnológica (Cohen & Boyer, 1992). Historicamente, el primer proceso derivado de la patente fue el de la producción microbiana de la insulina humana en 1980 (Quianson & Cheikh, 2012); este avance marca el inicio de lo que se conoce como la biotecnología moderna. Años después, a mediados de los años noventa del siglo xx, los avances en el área biológica originan la posibilidad de secuenciar genomas completos. Esta tecnología muestra enormes avances en muy poco tiempo, ya que de una manera cada vez más rápida y económica se logra obtener información sobre el ADN de miles de organismos. También a partir de las tecnologías de secuenciación surgen compañías encargadas en generar y analizar datos para el desarrollo de aplicaciones médicas y en la industria farmacéutica (Battelle Technology Partnership Practice, 2013).

* Es necesario entender la diferencia entre área de conocimiento y disciplina. La disciplina está relacionada con la formación académica que se ofrece de forma sistemática y ordenada dentro de un área de conocimiento. Mientras que el área conocimiento es un concepto el cual agrupa distintas disciplinas con afinidad en temas del conocimiento. En resumen, ser un ingeniero biólogo no implica ser un biotecnólogo.

Actualmente, la secuenciación de genomas y las tecnologías de ADN recombinante han impulsado cada vez más la generación de conocimiento sobre las funciones de los organismos vivos, por lo que ha sido posible incrementar la capacidad de manipular a nivel genético los organismos, mejorando sus funciones biológicas y/o revelando nuevas. Por este motivo, es importante considerar que la biología comienza a adquirir mayor relevancia en la industrialización de las economías de los países con las capacidades necesarias para aplicaciones industriales y médicas de manera específica (National Research Council (U.S.). Committee on Industrialization of Biology: A Roadmap to Accelerate the Advanced Manufacturing of Chemicals, Board on Chemical Sciences & Technology et al, 2015).

Históricamente, la ingeniería química y la ingeniería bioquímica han demostrado el potencial de aplicación que se puede alcanzar por medio de manejar agentes biológicos para la generación de productos, pero en esta era post-genómica se deberá aprovechar aún más el conocimiento generado en las ciencias de la vida. Esto significa que la industrialización de la biología requerirá de la integración de nuevas capacidades disciplinares. Por lo tanto, el ingeniero biólogo surge como una figura clave en el desarrollo y diseño de procesos y productos, pero con énfasis en la aplicación de la biología. Éste deberá conjuntar el conocimiento disponible de la ingeniería de procesos aprovechando las ventajas de las tecnologías de ADN recombinante y de manera conveniente confeccionar microorganismos y células con la capacidad de producir compuestos químicos, así como biomoléculas de interés comercial. Aún más, el diseño del agente biológico deberá ser parte de un marco conceptual del diseño de los bioprocesos.

Para incentivar a quien esté interesado en la ingeniería biológica, en la tabla 1.1. se mencionan algunos de los campos de aplicación y generación del conocimiento en donde un ingeniero biólogo puede desarrollar sus intereses.

Tabla 1.1. Campos de desarrollo para el ingeniero biólogo.

Campo	Descripción
Bioenergía	Nuestra principal fuente de energéticos sigue siendo el petróleo, un recurso que se considera finito. Tomando conciencia de esta limitación se busca ahora el uso de recursos renovables basados en la biomasa vegetal. El caso de mayor trascendencia es la producción de etanol para combustibles de autos.
Biomateriales	La ciencia de los materiales está asociada a la generación de polímeros con aplicaciones industriales, muchos de estos se derivan del petróleo. Como alternativa se buscan materiales que puedan reemplazar a los actuales pero que involucren un componente biológico, como puede ser una proteína, o que interaccionen con estructuras vivas como células. Igualmente, estos materiales pueden funcionar en equipos biomédicos para llevar a cabo una función biológica. Dentro de este campo de investigación las nanotecnologías juegan un papel muy importante.
Biosensores	El conocimiento de los componentes biológicos tales como, proteínas o moléculas de ARN así como sus interacciones entre ellas, ha permitido el diseño de biosensores para detectar diversas moléculas. Por ejemplo, de contaminantes como cianuro o en la detección de virus.
Bioprocesos	Se requiere de procesos que hagan uso de sistemas biológicos para transformar la materia prima en productos de interés comercial, tales como: enzimas o proteínas recombinantes con fines terapéuticos. Hay que considerar que en años recientes se han modificado genéticamente una gran cantidad de microorganismos para la producción industrial, y es posible que se requiera de reconfiguraciones de los procesos de fabricación que tradicionalmente se han utilizado.
Ciencia y Tecnologías de los Alimentos	Una necesidad básica del ser humano es el alimento, y cada vez se requiere de mejorar los productos, así como sus procesos de producción. Como se había mencionado anteriormente, la posibilidad de generar plantas transgénicas es un tema controvertido, pero que ha demostrado el potencial de diseñar organismos con capacidades adecuadas para la producción de alimentos. Inclusive se habla de una industria de elaboración de productos a partir de plantas transgénicas, por ejemplo: los nutraceuticos y prebióticos.
Biotecnología industrial	Al igual que en el caso de los bioenergéticos, se requiere también sustituir la producción de la industria química basada en el petróleo, especialmente de los precursores para plásticos, por una industria basada en productos renovables, como la biomasa vegetal. Actualmente, este campo ha generado los primeros productos para la elaboración de plásticos, tal es el caso del 1,3 propanodiol.
Ingeniería molecular, celular y de tejido	En este campo se busca lograr la generación de tejidos y órganos para aplicaciones médicas, inclusive, con la finalidad de ser usados para llevar a cabo las pruebas de fármacos; reemplazando el uso de animales.

Farmacéutica	En este campo las aplicaciones han sido tradicionalmente orientadas a la producción de proteínas recombinantes, moléculas químicas y la generación de procesos para su producción. Sin embargo, existe una nueva tendencia de aplicación que consiste en el estudio de la liberación controlada de fármacos en el sistema, así como de la terapia genética.
Ingeniería de células madre	Este campo se encuentra en una fase de desarrollo e investigación, con la intención de encontrar nuevas terapias médicas.
Ingeniería de proteínas	Tanto en aplicaciones farmacéuticas como en el campo de la biotecnología industrial, es necesario poder diversificar y orientar las capacidades funcionales de las proteínas, con la intención final de proveer nuevos productos y procesos.
Ingeniería ambiental	Los sistemas biológicos han sido utilizados en la biorremediación de suelos y limpieza de efluentes gaseosos. En el caso de tratamiento de aguas, se hace uso de comunidades microbianas (lodos activos) que permiten la limpieza de cargas orgánicas, pero existen compuestos persistentes, como los microcontaminantes, los cuales deben ser removidos. Otro caso de aplicación en este campo, se basa en la capacidad de los sistemas biológicos para captar gases de efecto invernadero como dióxido de carbono y metano, es posible una limpieza del ambiente, además de poder utilizar estos gases como fuentes de carbono para la producción de combustibles.

En conclusión, la industrialización de la biología es una actividad que está creciendo gracias a los avances en las ciencias biológicas. Para lograrlo, requiere generar nuevos procesos y productos, o mejorar los que actualmente están involucrados en la producción de una gran cantidad de productos y servicios; desde alimentos y organismos hasta químicos y materiales. Con base en estas necesidades se plantea una configuración de planta de procesos, la biorefinerías, en donde será posible conjuntar todos estos procesos encargados de la producción de combustibles, químicos, calor, energía y materiales; partiendo de materia primas renovables como la biomasa vegetal, o algas. Para lograrlo se deberán integrar procesos altamente eficientes diseñados por ingenieros altamente calificados (Cherubini 2010).

Oferta educativa de la ingeniería biológica en México

La biotecnología en México es un área que ha venido creciendo en los últimos años y que está generando productos y servicios (Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN 2010). Generalmente este comportamiento se relaciona con la oferta educativa ya que se necesita gente preparada para emplearse en esta industria en crecimiento. Para entender esta relación, se consultó el documento titulado “Anuario Estadístico de

Educación Superior-Licenciatura” para el periodo 2015-2016 publicado por la Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES). En este documento se reporta la información relacionada con las licenciaturas que se imparten en instituciones de estudio educación superior. Está organizada tomando en cuenta atributos como: número de licenciaturas ofrecidas, alumnos registrados, universidades y estados de la República Mexicana.

En una primera exploración de los datos, se observa que actualmente muchos programas de estudio intentan involucrar temas relacionados a las ciencias biológicas; debido al impacto social que la biotecnología ha tenido en años recientes. Por ejemplo: ingeniería de procesos a ingeniería de bioprocesos, ingeniería de materiales a ingeniería de biomateriales, etc. Por lo tanto, se realizó una búsqueda de las licenciaturas que tuvieron relación con las áreas del conocimiento que también se involucran en ingeniería biológica. Se consideraron licenciaturas afines aquellas por su orientación a un contenido biológico. Las palabras claves que se utilizaron para filtrar los datos del reporte de la ANUEIS son:

- Ingeniería Bioquímica
- Ingeniería en Biotecnología
- Bioingeniería
- Ingeniería Biomédica
- Ingeniería en Bioprocesos
- Ingeniería en Biosistemas
- Ingeniería Biomolecular

En el anuario de la ANUIES existen títulos como “Licenciatura en Ingeniería Bioquímica” o “Ingeniería Bioquímica”, ambos títulos se consideraron iguales. El mismo criterio se aplicó a títulos como “Ingeniería Biomédica” o “Ingeniería Biomédico”. Se omitieron las carreras de Bioquímica, Biotecnología, Agrobiotecnología y Biotecnología Agrícola, por no considerarse como disciplinas de ingeniería.

Como resultado del análisis, se encontró que son 124 carreras afines las que se ofrecen en México distribuidas en 95 instituciones de educación superior, tanto públicas como privadas. En la tabla 1.2 se presentan 12 de ellas, donde se puede observar que son tres las carreras (ingeniería biotecnológica, ingeniería bioquímica e ingeniería biomédica), que se imparten en un gran número de instituciones, comparando con las otras.

Tabla 1.2. Número y tipo de carreras que se ofrecen en instituciones de educación superior y que se encuentran registradas en el ANUIES.

	Carreras	Número
1	INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA	39
2	INGENIERÍA BIOQUÍMICA	38
3	INGENIERÍA BIOMÉDICA	36
4	BIOINGENIERÍA	2
5	INGENIERÍA BIOQUÍMICO INDUSTRIAL	2
6	BIOINGENIERÍA MÉDICA	1
7	INGENIERÍA BIOLÓGICA	1
8	INGENIERÍA BIOQUÍMICA EN ALIMENTOS ESPECIALIDAD EN FERMENTACIONES	1
9	INGENIERÍA BIOQUÍMICO AMBIENTAL	1
10	INGENIERÍA BIOQUÍMICO EN ALIMENTOS	1
11	INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA	1
12	INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA	1
	TOTAL	124

En cuanto a la carrera de bioingeniería, se había mencionado que en ocasiones se considera como un sinónimo de ingeniería biológica. En la tabla 1.3, se puede observar que existen dos instituciones que ofrecen la carrera de bioingeniería: La Universidad Autónoma de Baja California y la Universidad Politécnica de Pachuca. No obstante, y de acuerdo con la página electrónica de esta última, se modificó el nombre a Ingeniería Biomédica (Página web de la Universidad Politécnica de Pachuca). En cuanto a la carrera de Bioingeniería se puede revisar en la página de la Universidad Autónoma de Baja California que esta se ofrece en el Campus Mexicali, pero su plan de estudios contiene un componente de especialización en el área de ciencias biomédicas.

Es interesante observar que la Universidad Abierta y a Distancia de México (UnADM) contiene el mayor número de alumnos registrados; siendo la carrera de ingeniería en biotecnología la que está en oferta. El Tecnológico de Monterrey también tiene registrado un gran número de estudiantes ofreciendo las licenciaturas en ingeniería en biotecnología, e ingeniería biomédica. En cuanto a la Universidad Autónoma Metropolitana, esta institución ofrece la carrera de ingeniería biomédica, ingeniería bioquímico industrial e ingeniería biológica encontrándose en tercer lugar, seguida del Instituto Politécnico Nacional que ofrece la carrera de ingeniería en biotecnología; ver tabla 1.3. Aunque se debe

mencionar que, en el caso de los Institutos Tecnológicos (como el de Celaya en la posición ocho), a partir de 2014 forman parte del Tecnológico Nacional de México (TecNM) el cual es un órgano federal que conjunta a 266 instituciones en los 32 estados. Por lo que en conjunto se puede decir que el Tecnológico Nacional de México es el que tiene mayor oferta educativa.

Tabla 1.3. Número de alumno de las primeras 10 instituciones que tienen registrada al menos una de las licenciaturas afines.

	Institución	Alumnos
1	UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO	2 644
2	INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY	2 432
3	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA	1 865
4	INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	1 733
5	UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA	1 033
6	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA	808
7	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE PACHUCA	689
8	INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA	676
9	UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL VALLE DE TOLUCA	604
10	TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC	594

En conclusión, con los datos del ANUIES podemos establecer que la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM-C es de carácter innovador en México.

Literatura disponible para el estudio de la ingeniería biológica

Como se ha mencionado anteriormente, la ingeniería biológica es una disciplina que interacciona con otras disciplinas de ingeniería, por lo que se comparten distintos fundamentos y aplicaciones, lo que conduce a que exista disponible una vasta literatura que es común entre todas. Una revisión de la literatura disponible que sirva como guía para la adquisición del conocimiento de los fundamentos que requiere un ingeniero biólogo, dio como resultado que esta es muy amplia y por lo tanto no es posible establecer una bibliografía única. Sin embargo, se considera que hay temas que son básicos para la disciplina, tales como: ingeniería de bioprocesos, bioprocesos de separación, ingeniería metabólica,

ingeniería biomédica, temas ambientales, microbiología y biomateriales, entre otros. En la tabla 1.4, se incluyen los títulos y una descripción breve de los temas. Algunos de estos títulos tienen más de diez años de haber sido publicados, pero pueden considerarse como bibliografía base por su calidad de contenido y vigencia. Pocos son los libros en español y de reciente edición; sin embargo, los que existen son unas excelentes fuentes de consulta.

Tabla 1.4. Bibliografía recomendada que contienen los fundamentos necesarios para el estudio de la ingeniería biológica.

Título-Autor	Contenido
<p>Ingeniería Bioquímica. <i>Rodolfo Quintero Ramírez</i> (Quintero Ramírez 1981).</p>	<p>Crecimiento microbiano. Cinética de fermentaciones. Cultivo continuo. Transferencia de oxígeno y diseño de fermentaciones. Escalamiento de fermentaciones. Métodos de esterilización del medio de cultivo y del aire. Procesos de separación y purificación. Proteína unicelular. Producción de proteína microbiana a partir de la caña de azúcar y sus subproductos. Tecnología enzimática</p>
<p>Biochemical Engineering Fundamentals. <i>James Bailey & David Ollis.</i> (Bailey & Ollis David 1986)</p>	<p>Catálisis enzimática aplicada. Energía y estequiometría del metabolismo. Cinética del consumo de sustrato. Formación de producto y biomasa en cultivos celulares. Transporte de fenómenos en sistemas de bioprocesos. Diseño y análisis de los reactores biológicos. Operaciones en la recuperación de producto. Economía de los bioprocesos.</p>
<p>Biochemical Engineering, <i>D.S. Clark & H.W. Blanch</i> (Blanch & Clark 1996).</p>	<p>Catálisis enzimática. Biocatálisis inmovilizada. Crecimiento microbiano. Diseño y análisis de biorreactores. Proceso de transporte. Recuperación de producto. Interacciones microbianas. Bioproductos y economía.</p>
<p>Bioprocess Engineering Principles. <i>Pauline Doran</i> (Doran 2012)</p>	<p>Balances de Materia y Energía. Mezclado. Transferencia de calor y masa. Operaciones Unitarias. Ingeniería de reactores.</p>
<p>Enzyme Biocatalysis: Principles & Applications. <i>A. Illanes</i> (Illanes 2008).</p>	<p>Producción de enzimas. Cinética enzimática homogénea y heterogénea. Reactores enzimáticos. Casos de estudio de proceso enzimáticos.</p>
<p>Introduction to Biochemical Engineering. <i>D.G.Rao</i> (Rao 2010).</p>	<p>Introducción a los fundamentos de bioprocesos, microbiología y bioquímica. Enzimas. Fermentación. Esterilización. Cinética microbiana. Reactores ideales. Transferencia de calor y masa en bioprocesos. Sistemas reactivos heterogéneos. Biorreactores y fermentadores. Recuperación de productos. Tratamiento de efluentes. Diseño y análisis de biorreactores. Economía de bioprocesos. Reacciones múltiples. Flujos no ideales. Reología y mezclado.</p>

<p>Bioreaction Engineering Principles. <i>Villadsen, J. Nielsen, & G. Lidén (Villadsen, Nielsen et al, 2011).</i></p>	<p>Ingeniería química de rutas biológicas. Balance elemental. Redes de reacción bioquímicas. Cinética enzimática y control metabólico. Cinéticas de crecimiento. Análisis del balance de poblaciones. Diseño de fermentadores y procesos. Transferencia de masa gas-líquido. Escalamiento de bioprocesos.</p>
<p>Biochemical engineering: principles & concepts. <i>S.T.A. Inamdar (Inamdar 2012).</i></p>	<p>Fundamentos de microbiología. Biología de polímeros. Enzimas y cinética enzimática. Enzimas industriales y aplicaciones. Tecnología de inmovilización de enzimas. Producción de biomasa en cultivos celulares. Reactores biológicos. Tecnología de fermentación. Procesos tradicionales y productos. Procesos río abajo.</p>
<p>Cell Culture Bioprocess Engineering. <i>W.S. Hu & W. Zhou (Hu & Zhou 2012).</i></p>	<p>Biología celular para bioprocesos. Fisiología celular para ingenieros de procesos. Diseño de medios para cultivo celular. Desarrollo de líneas celulares. Estequiometría, cinética, análisis de datos, análisis de flujo metabólico, biorreactores y transferencia de oxígeno en cultivos celulares. Cultivos de lote alimentado y alimentación de nutrientes dinámicas. Escalamiento y genómica de cultivos celulares.</p>
<p>Biocatalysts & Enzyme Technology. <i>K. Buchholz, V. Kasche, & U.T. Bornscheuer (Buchholz, Kasche et al, 2012).</i></p>	<p>Conceptos básicos de enzimas como biocatalizadores. Innovación en enzimas e ingeniería de proteínas. Producción y purificación de enzimas. Aplicaciones de enzimas en suspensión e inmovilizadas.</p>
<p>Bioprocess engineering: basic concepts. <i>ML Shuler, F Kargi (Shuler & Kargi 2002)</i></p>	<p>Conceptos básicos de ingeniería de bioprocesos. Enzimas. Células. Principales rutas metabólicas. Estequiometría del crecimiento microbiano y formación de producto. Consideraciones en la operación de biorreactores para cultivos en suspensión e inmovilizados. Selección, escalamiento, operación y control de biorreactores. Recuperación y purificación de productos. Consideraciones importantes para el cultivo de células animales y de plantas. Aplicaciones médicas de la ingeniería de bioprocesos. Cultivos mixtos.</p>
<p>Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, & Reactor Design. <i>S.Liu (Liu 2013).</i></p>	<p>Una perspectiva de las reacciones. Reactores por lote y de flujo ideal. Teoría cinética y de reacción. Estimación de parámetros. Enzimas. Metabolismo celular. Cultivos continuos y por lote alimentado. Sustentabilidad. Diseño y operación de biorreactores.</p>
<p>Bioprocess Engineering: An introductory Engineering & Life Science Approach. <i>K.G Clarke (Clarke 2013).</i></p>	<p>Aspectos históricos de la producción de etanol y biofármacos. Microbiología. Moléculas metabólicas. Biología molecular. Cinética microbiana en cultivos por lote, continuos y lote alimentado. Transferencia de oxígeno. Escalamiento de bioprocesos. Procesos río abajo.</p>

<p>Bioengineering. <i>M. Pavlovic (Pavlovic 2015).</i></p>	<p>Fisiología celular. Genómica. Proteómica. Sistemas neuronales. Control endocrino e inmunológico. Células madre. Sistemas respiratorio y digestivo. Fundamentos de bioimágenes. Biomateriales. Nanotecnología. Ingeniería de cultivo celular. Ingeniería de tejidos.</p>
<p>Biochemical Engineering & Biotechnology. <i>G. Najafpour (Najafpour 2015).</i></p>	<p>Microbiología industrial. Medición de oxígeno disuelto y mezclado. Aeración y agitación. Control del proceso de fermentación. Crecimiento cinético. Procesos río abajo. Casos de estudio: producción de antibióticos, ácido cítrico, proteína unicelular y etanol. Esterilización. Procesos río abajo.</p>
<p>Bioseparations Science & Engineering. <i>R.G. Harrison, P.W. Todd, S.R. Rudge, & D.P. Petrides (Harrison, Todd et al, 2015).</i></p>	<p>Introducción a los bioproductos y bioseparaciones. Lisis celular y floculación. Filtración. Sedimentación. Extracción. Cromatografía. Precipitación. Cristalización. Evaporación. Secado. Diseño y economía de bioprocesos.</p>
<p>Bioseparation Engineering. <i>Ajay Kumar & Abhishek Awasthi (Kumar & Awasthi 2009).</i></p>	<p>Ingeniería de bioseparaciones. Lisis celular y floculación. Filtración. Sedimentación. Extracción. Cromatografía. Precipitación. Cristalización. Evaporación. Secado. Diseño y economía de bioprocesos. Separación por membranas. Electroforesis.</p>
<p>Ingeniería de Bioprocesos. <i>Mario Díaz (Díaz Fernández 2012).</i></p>	<p>Balances de materia y energía. Transformaciones biológicas. Comportamiento en el flujo de fluidos. Bombeo de fluidos. Mezcla con materiales fluidos. Transmisión de calor.. Cambiadores. Transmisión de calor. Operaciones. Transferencia de materia. Suministro de oxígeno. Separación de productos. Por velocidad y en mallas. Separación de productos. Transferencia entre fases. Operaciones con aire. Manejo de sólidos. Biorreacciones. Transformaciones enzimáticas. Biorreacciones microbianas. Inactivación e inhibición de microorganismos. Cultivos celulares más complejos y poblaciones mezcladas. Biorreactores para organismos. Fase sólida. Biorreactores para seres vivos en fase líquida. Biorreactores discontinuos. Biorreactores continuos. Tratamientos biológicos de aguas. Consideraciones complementarias de Ingeniería. Diseño de productos. Introducción a los aspectos económico. Consideraciones sobre las normativas legales. Anexos.</p>
<p>Bioseparaciones. <i>Tejada, M., Montesinos, A., & Guzmán, R. M. (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011)</i></p>	<p>Proceso de bioseparaciones. Síntesis del Bioprocesos. Filtración. Centrifugación. Rompimiento de células. III Concentración del Producto. Extracción. Adsorción. Cromatografía por Elución. Precipitación. Ultrafiltración. Electroforesis. Cristalización. Secado. Análisis del Bioproceso</p>

En cuanto a la oferta de revistas especializadas para la consulta de los avances científicos esta es aún mayor comparada con la oferta de libros (tabla 1.5). Sin embargo, se propone una lista basados en la antigüedad de la publicación y que aún son vigentes y con impacto, y también se incluyen algunas de las más recientes.

Tabla 1.5. Revistas recomendadas.

Nombre	Fecha de inicio de la publicación
Biotechnology & Bioengineering	1962
Biotechnology Letters	1979
Applied Biochemistry & Biotechnology	1981
Biotechnology Advances	1983
Journal of Biotechnology	1984
Biotechnology Progress	1985
Journal of Chemical Technology & Biotechnology	1986
Biotechnology & Bioprocess Engineering: BBE	1996
Biochemical Engineering Journal	1998
Journal of Bioscience & Bioengineering	1999
Metabolic Engineering	1999
Bioprocess & Biosystems Engineering	2001
Engineering in Life Sciences	2002
Molecular Systems Biology	2005
PLoS Computational Biology	2005
BMC Systems Biology	2007
Journal of Biological Engineering	2007
Systems & Synthetic Biology	2007
Cellular & Molecular Bioengineering	2008
ACS Synthetic B	2012
JSM Biotechnology & Biomedical Engineering	2013
Journal of Biomimetics, Biomaterials & Biomedical Engineering.	2014

Bibliografía

- Bailey, J. & F. Ollis David. (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. Nueva York, E.U.A.: Mc Grow Hill Book Company.
- Battelle Technology Partnership Practice. (2013). Recuperado de: https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/publicat/2013BattelleReportImpact-of-Genomics-on-the-US-Economy.pdf
- Blanch, H. W. & D. S. Clark. (1996). *Biochemical engineering*. Nueva York, E.U.A.: M. Dekker.
- Buchholz, K., V. Kasche & U. T. Bornscheuer. (2012). *Biocatalysts & enzyme technology*. Nueva Jersey, E.U.A.: Wiley-Blackwell.
- Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del IPN. (2010). *La biotecnología en México: Situación de la biotecnología en el mundo y situación de la biotecnología en el México y su factibilidad de desarrollo*. Recuperado de: http://www.gbcbiotech.com/en/imagenes/biotecnologia/33BioTecnologia_mexico.pdf
- Cherubini, F. (2010). *The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy & chemicals*. *Energy Conversion & Management* 51(7), 1412-1421.
- Clarke, K. G. (2013). *Bioprocess engineering: An introductory engineering & life science approach*. Oxford, Gran Bretaña: Elsevier.
- Cohen, S. N. & H. W. Boyer (1992). Process for producing biologically functional molecular chimeras. 1979. *Biotechnology*, 24, 546-555.
- Díaz Fernández, M. (2012). *Ingeniería de bioprocesos*. Madrid, España: : Paraninfo.
- Doran, P. M. (2012). *Bioprocess engineering principles*. Oxford, Gran Bretaña: Academic Press.
- Institute of Biological Engineering (IBE, 2017). What is biological engineering?. Recuperado de: <http://www.ibe.org/resources/what-is-biological-engineering>.
- Harrison, R. G., P. Todd, D. P. Petrides & S. R. Rudge. (2015). *Bioseparations Science & Engineering*. Nueva York, E.U.A.: Oxford University Press.

- Hu, W.-S. & W. Zhou (2012). *Cell culture bioprocess engineering*. Minneapolis, E.U. A.: Department of Chemical Engineering & Material Science.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: principles & applications*. Nueva York, E.U.A.: Springer.
- Inamdar, S. T. A. (2012). *Biochemical engineering: principles & concepts*. Nueva Delhi, India: PHI.
- Johnson, A. T. (2006). The making of a new discipline. *International Journal of Engineering Education* 22(1), 3.
- Kumar, A. & A. Awasthi (2009). *Bioseparation engineering*. Nueva Delhi, India: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.
- Liu, S. (2013). *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability, & Reactor Design*. Oxford, Gran Bretaña: Elsevier.
- Najafpour, G. (2015). *Biochemical Engineering & Biotechnology*. Oxford, Gran Bretaña: Elsevier.
- National Research Council, Division on Earth & Life Studies, Board on Chemical Sciences & Technology. (2015). *Industrialization of biology : a roadmap to accelerate the advanced manufacturing of chemicals*. Washington, D.C., E.U.A.: The National Academies Press
- Universidad Politécnica de Pachuca (UPP, 2017). *Página web de la Universidad Politécnica de Pachuca*. Recuperado de: [http:// www.upp.edu.mx/3esp/index.php/institucion](http://www.upp.edu.mx/3esp/index.php/institucion)
- Pavlovic, M. (2015). *Bioengineering*. Nueva York, E.U.A: Springer.
- Quianzon, C. C. & I. Cheikh (2012). History of insulin. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 2(2) Recuperado de: <https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701>
- Quintero Ramírez, R. (1981). *Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones*. Ingeniería bioquímica: Teoría y aplicaciones, Alhambra Mexicana.
- Rao, D. G. (2010). *Introduction to biochemical engineering*. Nueva Delhi, India: Tata Mc-Graw Hill Education.
- Shuler, M. L. & F. Kargi (2002). *Bioprocess engineering*. Nueva Jersey, E.U.A.: Pretience Hall.

Tejada Mansir, A., R. M. Montesinos Cisneros & R. Guzmán Zamudio (2011). *Bioseparaciones*. Estado de México, México: Pearson Educación México.

Villadsen, J., J. H. Nielsen, G. Lidén & J. H. Nielsen (2011). *Bioreaction engineering principles*. Nueva York, E.U.A.: Springer.

Capítulo 2

Campos laborales del ingeniero biólogo

Introducción

Durante su proceso de formación, el ingeniero biólogo debe adquirir conocimientos y habilidades en temas de ciencias: matemáticas, física, química y biología, además de los conocimientos de ingeniería, como ingeniería procesos, biorreactores, procesos de separación, operaciones unitarias, por mencionar algunos. Igualmente, con los avances en las ciencias de la vida el ingeniero biólogo tiene herramientas para el desarrollo tecnológico en áreas como la biotecnología, genómica, la ingeniería metabólica, biomateriales, alimentos, biomédica e ingeniería ambiental. Todo este cúmulo de conocimiento y habilidades ofrece al ingeniero biólogo un panorama para desarrollar su actividad profesional en diferentes sectores económicos y las industrias que se incluyen. En este capítulo se describen algunos tipos de industria en donde el ingeniero biólogo puede llevar a cabo sus labores e impactar de manera favorable. Se puede ver que los diferentes tipos de industria siguen teniendo como objetivo cubrir las necesidades básicas de la sociedad, alimento, salud y ambiente limpio.

En las últimas décadas, las actividades económicas relacionadas al desarrollo biotecnológico se han venido incrementado. El término bioeconomía se ha acuñado para definir las actividades económicas donde se lleva a cabo la producción de materiales renovables de procedencia biológica y su posterior procesamiento para obtener alimentos, biofármacos, productos químicos, materiales y biocombustibles, por medio de la innovación continua en el campo de la biotecnología. El objetivo final de la bioeconomía es poder enfrentar las necesidades sociales, combatir los problemas ambientales y generar bienestar económico. La bioeconomía involucra distintos sectores económicos más antiguos en la sociedad, como la producción de vino, pan y otros fermentados ha sido parte de la del desarrollo económico, no obstante, los avances en el campo de las ciencias de la vida tales como las tecnologías de ADN recombinante, la secuenciación y síntesis de ADN ha permitido un resurgimiento de la bioeconomía como un sector eje en el desarrollo de un país. Además, el desarrollo de la bioeconomía tiene un carácter sustentable debido a que involucra un amplio uso de materias primas sustentables. Por lo tanto, la actividad del ingeniero biólogo puede impactar en todos los sectores económicos, aplicando su conocimiento en industrias como la salud, ambiental, alimentario, energía, producción de químicos y materiales (Juma & Konde 2001, Kircher 2012).

Industria farmacéutica y biofarmacéuticos.

Esta industria involucra la producción de fármacos y biofármacos con una gran variedad de orígenes, características acciones terapéuticas, estabilidad y vías de administración. En cuanto su procedencia, en general los fármacos se obtienen por síntesis química, por ejemplo, el ácido acetil salicílico que se sintetiza a partir del ácido salicílico y el anhídrido acético, productos del petróleo. Por el otro lado, en la producción de los biofármacos intervienen los cultivos de organismos vivos (células, tejidos o animales), por ejemplo, la insulina recombinante la cual se obtiene por medio de cultivos microbianos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Baeshen, Baeshen et al, 2014). En el caso de las plantas, que son organismos vivos, se pueden obtener fármacos y biofármacos. Los fármacos se obtienen por métodos de extracción; un ejemplo es la morfina obtenida a partir del opio, o la artemisinina para combatir la malaria. Aunque la idea de trabajar con plantas para producir proteínas recombinantes no es nueva, en los últimos años se ha intensificado los esfuerzos para hacer realidad su producción. Por ejemplo, la taliglucerasa alfa es un enzima que se expresa en células de zanahoria genéticamente modificadas y fue aprobada en 2012 para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Este trastorno congénito provoca la acumulación anormal de lípidos complejos en células de hígado y médula ósea debido a la ausencia de la enzima glucocerebrosidasa (Grabowski, Golembowski et al, 2014).

En cuanto al proceso de producción, los biofármacos provienen de procesos de fermentación o cultivos celulares y procesos de alta purificación lo que eleva los costos generalmente. En la última década la manufactura de biofármacos se ha incrementado; se considera que actualmente existen 200 productos distintos en el mercado. De las características que mayor impacto tienen en el proceso de producción son, la estabilidad de la molécula y selectividad. De esta manera los procesos de producción se han venido innovando para lograr mayores rendimientos. En este aspecto, se han diseñado biorreactores de un solo uso, desechables, e inclusive se está planteando el uso de procesos continuos para incrementar la producción. El conocimiento de ingeniería genética, tecnología de fermentaciones, cultivos celular y procesos de purificación son de gran importancia en el diseño de producción de biofármacos.

Tabla 2.1. Ejemplos de biofármacos producidos en *Escherichia coli*, levadura y células mamíferas (Walsh 2000).

Grupo terapéutico	Proteína recombinante	Hospedero
Trombolíticos y anticoagulantes	Factor VIII Activador Tisular del Plasminógeno	células mamíferas
Hormonas	Insulina Hormona de crecimiento Glucagón	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>
Factores de crecimiento	Eritropoyetina Factor estimulante de colonias de granulocitos	Células mamíferas Células mamíferas. <i>E. coli</i> .
Citocinas	Interferón alfa Interferón alfa	<i>E. coli</i> . <i>E. coli</i> .
Enzimas	alfa-galactosidasa desoxirribonucleasa	Células mamíferas Células mamíferas

Sector alimentos

Con el ritmo actual de crecimiento de la población, se estima que para el año 2050 habrá un incremento del 60% en la demanda de alimento, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. La demanda implica una gran presión por incrementar la producción global de alimentos con los recursos disponibles de tierra y agua.

El sector de alimentos abarca una enorme cantidad de industrias. De acuerdo con el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México) el sector alimentos comprende desde los productos agrícolas, pecuario, forestal o pesquero hasta la transformación de estos productos y entrega al consumidor final. Por lo tanto, implica diversos segmentos productivos como la elaboración de alimentos para animales, elaboración de azúcar, conservación de frutas y hortalizas, bebidas y productos lácteos, por mencionar algunos. En la tabla 2.2 se puede consultar el porcentaje de participación de los distintos segmentos en México.

Tabla 2.2. Participación de distintos segmentos productivos en el sector alimentario. Reporte Actinver (2013).

Segmento	Productos	Participación
Elaboración de alimento para animales.	Proteína animal, forraje	2.3%
Molienda de granos y semillas oleaginosas.	Harinas	8.9%
Elaboración de azúcar, chocolates, dulces y similares.	Se incluyen los jarabes dulces	6.2%
Conservación de frutas, verduras y alimentos preparados.	Mermeladas y hortalizas empacadas	4.2%
Elaboración de productos lácteos.	Quesos, cremas, mantequillas	12.6%
Matanza, empaçado y procesamiento de ganado y aves.	Venta de carne refrigerada	22.0%
Preparación y empaçado de mariscos y pescados.	Venta de carne refrigerada	0.8%
Elaboración de productos de panadería y tortillas.	Incluye frituras	31.5%
Otras industrias (aderezos, botanas, café, té concentrados y perecederos)	Concentrados como los jugos	11.5%

Los alimentos procesados se dan en gran volumen e implica el desarrollo y diseño de procesos para su obtención. La industria de la cerveza requiere del uso de las tecnologías de la fermentación y el manejo de microorganismos. La industria del queso requiere de enzimas para su producción. Actualmente hay tendencias por el incremento en la producción de nutraceuticos debido al impacto favorable que estos tienen en la salud humana (Noviendri, Hasrini et al, 2011).

Ambiente

A diferencia con los sectores económicos mencionados anteriormente, no existe un sector industrial relacionado al ambiente, es decir, las tecnologías ambientales como la biorremediación de suelos, tratamiento de agua y limpieza de contaminantes en el aire no se considera parte de una industria de manufactura, sino un sector de servicios, lo que constituyen un conjunto de tecnologías con el propósito de que las distintas industrias cumplan con

normas ambientales. Actualmente, debido a los problemas derivados de la contaminación de suelo y agua, y la emisión de gases de efecto invernadero, la ONU ha convocado a los países para que planteen en sus políticas de crecimiento económico un desarrollo industrial sostenible. Esto implica que el consumo y producción de los bienes y servicios deben estar contenidos en un marco de desarrollo que garantice una mejor calidad de vida reduciendo la sobreexplotación y contaminación de los recursos naturales (Velasco, Hernández Jimenez et al, 2016). No obstante, en los últimos años, se pretende cambiar esta concepción de ser sólo de servicios para pasar a una industria de carácter productivo.

Producción de químicos

El metabolismo celular contiene un gran número de reacciones químicas catalizadas por enzimas (biorreacciones) y que se organiza de tal manera que forman conjuntos de rutas metabólicas. En el capítulo anterior, se comentó que un hito en la generación de datos y conocimiento de los sistemas biológicos fue la secuenciación genómica y debido a la gran cantidad de información que se obtuvo ésta tuvo que ser organizada en bases de datos especializadas. Por ejemplo, KEGG y MetaCyc son las bases de datos que contiene las rutas metabólicas de cientos de organismo vivos. Entre estas dos bases de datos en promedio se tiene el registro de 9000 reacciones bioquímicas y 7000 compuestos (metabolitos), aproximadamente (Altman, Travers et al, 2013). Esta cantidad de compuestos implica un repositorio muy vasto de productos químicos, algunos conocidos, y otros con el potencial de generar nuevos productos; sin embargo, para poder acceder al resto de los productos químicos y alcanzar volúmenes industriales, es necesario desarrollar nuevas tecnologías y configuraciones de bioprocesos (National Research Council, Division on Earth & Life Studies, Board on Chemical Sciences & Technology, 2015).

Generalmente, en la manufactura de químicos se hace diferencia entre los distintos productos químicos. Los químicos especializados, los cuales son de alto valor comercial, por ejemplo, las enzimas y los fármacos, lo cuales pueden tener volúmenes de producción de gramos. Los químicos a granel se producen en volúmenes del orden de cientos de toneladas, por ejemplo, los combustibles o los intermediarios para la producción de polímeros como el etileno. Esta diferencia en volúmenes de producción entre los distintos productos también resulta en una diferencia en los costos de producción. En la figura 2.1 se presenta el margen bruto de distintas compañías dedicadas a la producción de distintos productos; enzimas, biofármacos y biocombustibles. Se puede distinguir en la figura que en la producción de químicos como los biocombustibles el margen bruto es mucho más pequeño que el de otras industrias. Uno de los factores de esta diferencia es el hecho de que los precios de productos químicos provenientes del petróleo son más competitivos que los productos provenientes de una base biológica como consecuencia de los costos de producción. Para competir con productos de procedencia biológica (*bio-based products*) se pueden abordar dos perspectivas, el diseño de procesos de producción más economi-

cos para su producción o la sustitución de los productos petroquímicos por compuestos equivalentes o con mejores propiedades para generar nuevos materiales y disminuir el impacto ambiental.

La elaboración de productos químicos utilizando materias primas renovables no es nueva, se calculan que, en suma, la cantidad de químicos y polímeros es de 50 millones de toneladas cada año (de Jong, Higson et al, 2012). En contraste, se estima que la producción de químicos y polímeros en la industria petroquímica es de aproximadamente 330 millones de toneladas. Estos valores implican que los productos químicos de procedencia biológica solo abarcan aproximadamente el 15% de los productos que se generan actualmente, esto significa que existe un área de oportunidad para el desarrollo de las actividades de la ingeniería biológica.

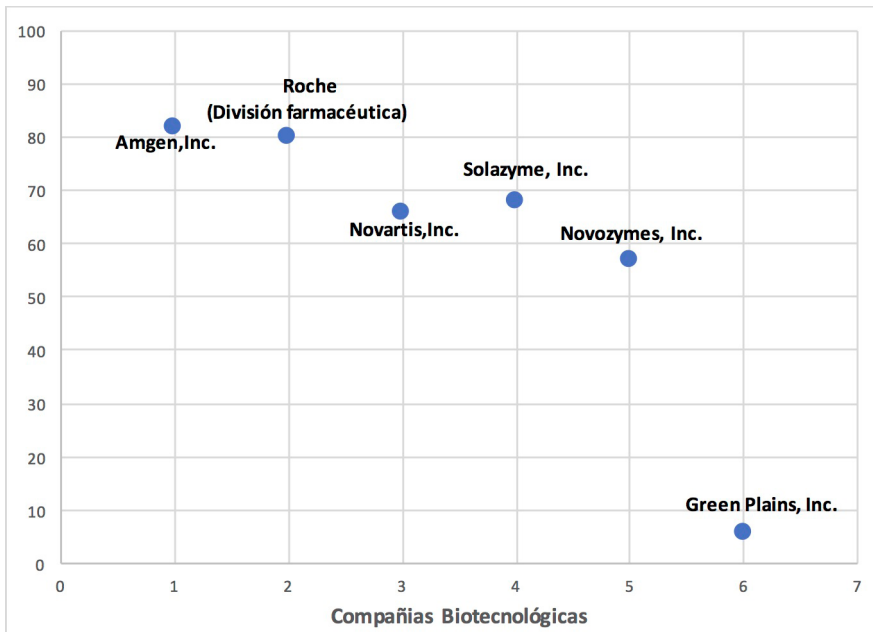


Figura 2.1. Esta figura representa el margen bruto (en porcentaje) de distintas compañías biotecnológicas representativas de la industria de producción de biofarmacéuticos (Amgen, Inc., Novartis Inc. y Roche), enzimas (Solazyme, Inc. y Novozymes, Inc.) y etanol (Green Plains Inc.). El margen de beneficio de la figura se calcula como el precio de venta (sin impuestos) menos el costo de producción del bien vendido, todo esto entre el precio de venta; por lo que se tiene un porcentaje (National Research Council, Division on Earth & Life Studies, Board on Chemical Sciences & Technology, 2015).

Biorrefinerías

De los 330 millones de toneladas de productos químicos y polímeros derivados del petróleo que actualmente se producen estos provienen de un número reducido de precursores primarios, estos son: metanol, metano, etileno, propileno, butadieno, xileno, benceno y tolueno. De cada uno de estos se obtienen distintos precursores secundarios que posteriormente se transforman en productos finales, por ejemplo, a partir del benceno se obtiene el ciclohexano y etil benceno. Del etil benceno se obtiene el estireno con el cual se obtiene el polímero llamado poliestireno. Este polímero se utiliza en la producción de textiles, por ejemplo. Para lograr estas transformaciones se han diseñado plataformas industriales, las refinerías y la industria petroquímica. En semejanza con las refinerías, para la producción de productos químicos de procedencia biológica se propone la creación de las biorefinerías, en donde los precursores primarios serán la celulosa, hemicelulosa, almidón, lignina, proteínas y aceites de origen vegetal o animal. Todos provenientes de distintas fuentes de biomasa, tales como, residuos forestales, agrícolas o cultivos especializados. Pero no solamente se esperan obtener productos químicos en las biorefinerías, también se están diseñando para la producción de biocombustibles, como el etanol y biodiesel e inclusive materiales y alimentos (Cherubini 2010, FitzPatrick, Champagne et al, 2010).

En la actualidad, uno de los principales sectores que impulsa la creación de las biorefinerías es el del transporte. Debido a la alta demanda de combustibles fósiles, el sector de transporte se encuentra bajo la presión de políticas de consumo renovable y sustentable de combustibles. Es en este sector, principalmente, en donde los biocombustibles deberán reemplazar en gran proporción del volumen de consumo actual del sector. Sin embargo, el principal contratiempo en el impulso de la creación de biorefinerías es el alto costo de producción comparados con los provenientes del petróleo. Esto ha conducido a que los biocombustibles solamente puedan entrar al mercado por medio de apoyo gubernamental, ya sea reduciendo los impuestos por su consumo, o por medio de regulaciones que incentiven el uso. No obstante, se plantea la eventual disminución de las reservas del petróleo por lo que es momento de que la industria y economía se preparen para enfrentar escenarios futuros. Actualmente, se proyecta que para que una biorefinerías sea competitiva, además de producir combustibles, debe estar diseñada para producir otros productos, como los químicos básicos y especializados, materiales y alimentos de manera integral y óptima (FitzPatrick, Champagne et al, 2010, Rodsrud, Lersch et al, 2012).

Cabe mencionar que dentro de la concepción de estas biorefinerías uno de los procesos clave para la producción de químicos será el proceso de fermentación. Se tiene constancia de que este proceso en los últimos 60 años constituye uno de los procesos ampliamente usados para la generación de productos químicos finos y, además, en la actualidad estos procesos se alimentan con azúcares y almidones. Hasta el año 2015 la demanda de químicos derivados de procesos de fermentación era de 56.98 millones de toneladas (Grand View Research 2016).

En la tabla 2.3 se mencionan algunos ejemplos del mercado global de productos químicos finos que actualmente se producen vía fermentación de azúcares. La proyección del año 2018 se hizo con una aproximación lineal.

Tabla 2.3. Mercados globales de algunos productos químicos finos.

Químico	En 2009 (millones USD)	En 2013 (millones USD)	En 2018 (millones USD)
Amino ácidos	5,410	7,821	11,306
Antibióticos	1,800	2,600	3,756
Ácidos orgánicos	2,651	4,036	6,145
Enzimas	3,200	4,900	7,503
Vitaminas	2,397	2,286	2,180
Xantana	443	708	1,132
Total	15,901	22,351	34,039

Para entender los valores, es necesario plantearse el escenario en donde un empresario decide crear una empresa para producir aminoácidos, por ejemplo. Con los valores de la tabla 2.3 significaría que para el 2018 la población y las empresas gastarán 11,306 millones de USD, y el empresario que decidió participar puede ingresar parte de ese dinero.

El poder comprender el valor de estos mercados nos indica una necesidad de desarrollar procesos cada vez más económicos para poder ser competitivos. Igualmente, se puede pensar en diversificar los diseños actuales para incluir diferentes tipos de materias primas. Por lo tanto, la ingeniería biológica jugará un papel muy importante en la producción de los distintos productos que actualmente usamos e innovará en la producción de nuevos.

Bibliografía

- Altman, T., M. Travers, A. Kothari, R. Caspi & P. D. Karp (2013). A systematic comparison of the MetaCyc & KEGG pathway databases. *BMC Bioinformatics*, 14(1), pg. 112.
- Baeshen, N., Baeshen M., Sheikh A., Bora R., Ahmed M., Ramadan H., ... Redwan, E. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(141), Pp. 1-9. Recuperado de: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy & chemicals. *Energy Conversion & Management*, 51(7), pp. 1412-1421
- De Jong, E., Higson, A., Walsh, P., & Wellisch, M. (2012). *Bio-based chemicals. Value Added Products from Biorefineries*. Recuperado de: <http://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Task-42-Biobased-Chemicals-value-added-products-from-biorefineries.pdf>
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M. & Whitney, R. (2010). A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101(23), pp.8915-8922.
- Grabowski, G., Golembo, M., & Shaaltiel, Y. (2014). Taliglucerasa alfa: an enzyme replacement therapy using plant cell expression technology. *Molecular, Genetics & Metabolism*, 112(1), pp. 1-8.
- Grand View Research. (2016). *Fermentation Chemicals Market Analysis By Product (Alcohols, Enzymes, Organic Acids), By Application (Industrial, Food & Beverages, Nutritional & Pharmaceuticals, Plastics & Fibers) & Segment Forecast To 2024*. Recuperado de: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/fermentation-chemicals-market>
- Juma, C. & Konde, V. (2001). *The New Bioeconomy: Industrial & Environmental Biotechnology in Developing Countries*. Recuperado de: <https://www.innovations.harvard.edu/sites/default/files/newbioeconomy.pdf>
- Kircher, M. (2012). The transition to a bio-economy: national perspectives. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 6(3), pp. 240-245.

- National Research Council, Division on Earth & Life Studies, Board on Chemical Sciences & Technology. (2015). *Industrialization of biology : a roadmap to accelerate the advanced manufacturing of chemicals*. Washington, D.C., E.U.A.: The National Academies Press.
- Noviendri, D., Hasrini, R., & Octavianti, F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties & their application in food & nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), pp. 7119-7131.
- Rodsrud, G., Lersch, M., & Sjode, A.(2012). History & future of world's most advanced biorefinery in operation. *Biomass & Bioenergy*, 46, pp. 46-59.
- Velasco, J.,Hernández, S. & Ortíz, I. (2016). Tecnologías para el control de la contaminación ambiental, parte I: aguas residuales, residuos sólidos, residuos peligrosos y suelos. En Castro, E. & Ramírez, R. (1ra.) *Sostenibilidad. Una visión multidisciplinaria*. (pp. 275- 294). D.F., México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Walsh, G. (2000). Biopharmaceutical benchmarks. *Nature biotechnology* 18(8), p. 831.

Capítulo 3

Bioprocesos

Adela Irmene Ortíz López

Arturo Alejandro Figueroa Montero

Miguel Sergio Hernández Jiménez

Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Raúl Muñoz Torre

Rodolfo Quintero Ramírez

Nohra Elsy Beltrán Vargas

Maribel Hernández Guerrero

Juan Gabriel Viguera Ramírez

Introducción

El proceso se entiende como un conjunto de operaciones organizadas de forma secuencial cuyo propósito es la transformación de la materia prima en productos útiles a la sociedad (bienes) u ofrecer algún servicio; en el caso de los procesos que involucran algún componente biológico se acostumbra usar el término de bioproceso. Como parte de los productos que se pueden obtener se encuentran los antibióticos, vacunas, amino ácidos, biocombustibles, etc.; en el caso de los servicios están: la biorremediación, el tratamiento de efluentes líquidos y gaseosos contaminados, y la biolixiviación (Wiley, Sherwood et al, 2013, Wiley, Sherwood et al, 2013).

La configuración de los bioprocesos puede ser tan amplia como productos y servicios se desean obtener cubriendo la producción en diferentes sectores industriales y se requieren de estrategias de diseño, simulación, optimización e innovación para alcanzar los objetivos de producción deseados. El rango de las productividades puede abarcar desde gramos por día, como lo pueden ser algunos biofármacos, hasta cientos de toneladas en el caso de químicos o biocombustibles. Lo cual implica a su vez que los contenedores para la producción alcancen valores de 1-30,000 metros cúbicos. Las tecnologías que se deben ocupar dependen en el tipo de producto y materia prima. Por ejemplo, para obtener etanol se requiere de un proceso de pretratamiento para extraer los azúcares fermentables de la caña de azúcar, para alimentar

una etapa de fermentación en donde se produce el alcohol por medio de una levadura. El etanol se separa del microorganismo por centrifugación y/o filtración para finalmente hacer la destilación hasta obtener el producto final. Si la materia prima cambia, digamos maíz, deberán cambiar las etapas de pretratamiento. En el caso de la producción de plantas, una actividad relacionada a la agricultura, el objetivo principal en el bioproceso es la obtención de la planta para alimento, o materia prima como caña de azúcar, e involucra una serie de actividades dirigidas a gestionar suelos, alimentos, fertilizantes e incluso la generación de organismos modificados genéticamente para aumentar los rendimientos.

El objetivo inicial del diseño de un bioproceso es lograr cada vez mayores productividades y rendimientos. No obstante, en las últimas décadas las necesidades de diseño de bioprocesos requieren de nuevos factores como lo es el manejo sustentable de las materias primas y desechos, implicando el desarrollo de nuevas tecnologías de producción para la optimización en costos.

Por lo tanto, el ingeniero biólogo debe aportar con nuevas visiones y estrategias de carácter innovador en la ingeniería de procesos para culminar con bioprocesos altamente competitivos y sustentables; además, con las características necesarias para resolver los retos futuros tales como:

- a. La necesidad de una actividad global sustentable, tanto en lo social, como en lo ambiental y económico.
- b. La reconfiguración de los bioprocesos actuales para el manejo de materias primas sustentables.
- c. Disminuir la dependencia de combustibles fósiles, e inclusive, llegar al punto de reemplazar su uso.
- d. Disminuir las consecuencias de cambio climático, a través del desarrollo de tecnologías para el tratamiento de efluentes gaseosos, líquidos y sólidos.
- e. Lograr el desarrollo regional de actividades primarias como la agricultura.
- f. Innovar en el desarrollo del cuidado de la salud humana por medio de la creación de nuevos biofármacos, materiales para nuevas terapias médicas e implementación de instrumentación biomédica.

El planteamiento de un proyecto como es el de diseñar bioprocesos requiere de muchas áreas del conocimiento y desarrollo técnico, sin embargo, existen tres puntos iniciales con los cuales se comienza a conceptualizar un proyecto, éstos son:

- i. **El tipo de materia prima.** En donde se tienen que contemplar factores como: el carácter renovable o no renovable; el alto costo o la dificultad de procesamiento.
- ii. **El agente biológico responsable de la transformación de la materia prima.** Puede ser de distinta naturaleza como las enzimas, microorganismos, células mamíferas, células de plantas o tejidos.

- iii. El tipo de producto o servicio.** Comprender si se busca la producción de químicos, enzimas, proteínas farmacéuticas, microorganismos, biomateriales, etc. O si se requiere de los servicios de tratamiento de desechos, lo cual implica que se debe considerar el aspecto del efluente a tratar —gaseoso, líquido o sólido— y los contaminantes a remover o reusar.

Cada uno de estos aspectos juega un papel fundamental en la concepción inicial del diseño. Una vez establecidas las necesidades, se comienzan a plantear las distintas operaciones que se requieren para la transformación o manejo del material, por ejemplo, tratándose de la producción de un producto como un químico o biofármacos, las operaciones son: (Shuler & Kargi 2002, Díaz Fernández, 2012)

- i. Pretratamiento de materia prima.** Éste puede incluir, por ejemplo, una sacarificación para la extracción de azúcares de residuos agroindustriales.
- ii. Preparación de insumos.** Tanto la materia prima como las corrientes líquidas deben estar esterilizadas. Por ejemplo, cuando se requiere de un insumo como el medio de cultivo para una fermentación es necesario ajustar parámetros como: pH, concentración de sales de distintos componentes (P, N, K, etc.) y temperatura.
- iii. Pre-inoculación.** Cuando se usan microorganismos o células, éstos son acondicionados de acuerdo con las variables del biorreactor hasta alcanzar concentraciones de biomasa celular lo suficientemente altas para mantener la producción a la escala deseada. Este acondicionamiento de las células en biorreactores (a veces denominados semilla) se lleva a cabo en pequeña escala, y gradualmente se incrementa hasta lograr iniciar el biorreactor a la escala de producción.
- iv. Fermentación o biorreacción.** Esta parte del proceso es la operación encargada de llevar a cabo la transformación biológica. Se puede llevar a cabo en un fermentador o biorreactor. La elección del equipo es clave para alcanzar las productividades deseadas. No solo en tamaño, sino el modo de operación que se desea (continua, en lote, o en lote alimentado), influyen en la configuración del proceso.
- v. Separación de biomasa o enzimas.** Concluido el proceso en el biorreactor, se requiere de una serie de operaciones que pueden consistir en procesos de filtración o centrifugación para separar las células, enzimas o microorganismos del caldo de cultivo que fueron responsables de la transformación de la materia prima.
- vi. Separación del producto.** El producto debe concentrarse y purificarse, esto implica una serie de operaciones como: ultrafiltración, extracciones, evaporaciones, cromatografía, intercambio iónico, entre otros procesos.

Las operaciones anteriores se organizan dentro de distintas etapas de proceso. Se tiene la etapa río arriba (*up-stream* en inglés) que incluye todas esas operaciones necesarias para preparar la materia prima; la etapa de biotransformación, en donde se introduce ya la materia prima a transformarse, el biorreactor o fermentador; y, finalmente, la etapa de río abajo (*down-stream*

en inglés), en donde se encuentran todas las operaciones necesarias para la separación. En la figura 3.1 se representa un esquema de las operaciones y etapas de un bioproceso que involucra una fermentación.

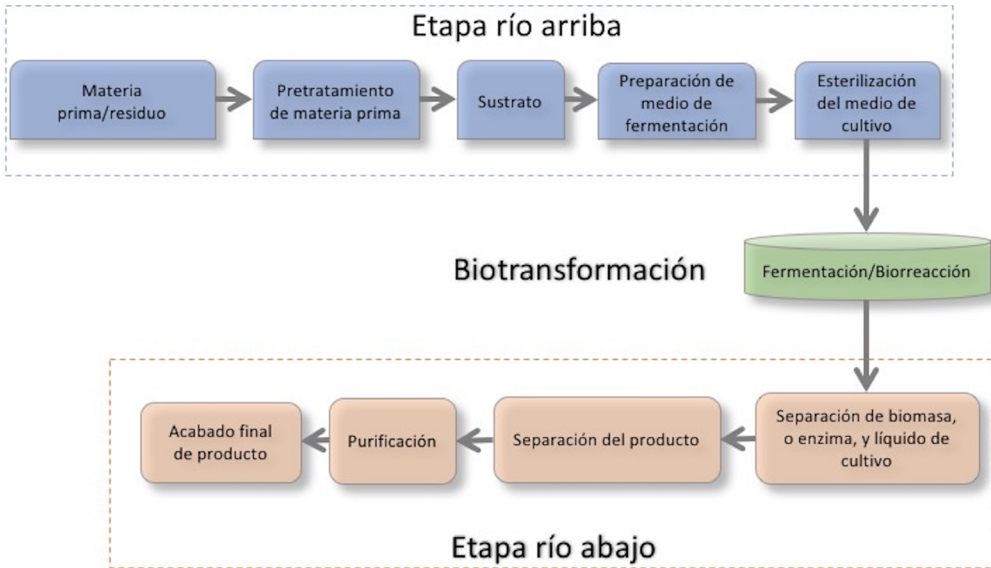


Figura 3.1. Ejemplo de las etapas y operaciones involucradas en un bioproceso que involucra una fermentación o biorreacción.

Para alcanzar un nivel de diseño óptimo e innovador, es necesario identificar que existen una serie de problemáticas en cada una de las etapas, las cuales se pueden resumir en seis puntos:

- i. **Materia prima y su preproceso.** Para mejorar la capacidad de producir materia prima económica y sustentable ambientalmente, se debe aumentar la disponibilidad de celulosa a partir de plantas, que pueden ser modificadas genéticamente para lograr los procesos de sacarificación de manera económica. Por ejemplo, el uso completo de la lignina, que resulta como producto alterno de la sacarificación. La posibilidad de convertir materias primas con características complejas en intermediarios útiles para su producción vía rutas metabólicas. El uso de otras fuentes como: dióxido de carbono, así como metano y sus derivados para alimentar bioprocesos. Esto implica la comprensión de la utilización de fuentes de carbono C1.
- ii. **Fermentación y procesamiento.** Es necesario diversificar las configuraciones de cultivo. Actualmente, los procesos aerobios y en lote realimentado son las dominantes en la producción de químicos. Sin embargo, se requiere mejorar la productividad de los fermentadores abordando los temas de: transferencia

de masa y calor; la elaboración y remoción continua de productos; explorar el uso de co-cultivos, co-productos y co-sustratos. Se requiere de herramientas computacionales y matemáticas con la capacidad de predecir el comportamiento de los bioprocesos utilizando experimentos a pequeña escala. A partir de estos instrumentos se pueden llevar a cabo las predicciones de escalamiento. A diferencia de muchos procesos químicos, los procedimientos de fermentación requieren grandes cantidades de agua, lo que genera grandes flujos de producto, siendo todo un reto para el manejo de la separación; también el uso eficiente de agua, deberá integrarse en el diseño.

- iii. **Generación de cadena de herramientas para el diseño de procesos.** Se requiere de protocolos experimentales definidos, que integren todas las herramientas para el diseño del bioproceso en todas las escalas, desde el manejo de las enzimas o células en el laboratorio y dentro del reactor, hasta el nivel de proceso. Igualmente, son muy necesarias las herramientas computacionales para el análisis y predicción en todos los niveles.
- iv. **Rutas metabólicas.** Se requiere del rápido rediseño de enzimas para modificar su capacidad catalítica y específica, e incluirlas en las rutas metabólicas.
- v. **Microorganismos.** Es importante generar cepas de manera rápida y eficiente, con capacidades específicas para el proceso de producción. Se requiere que sean estables genéticamente para mantener su rendimiento de manera prolongada. Además, deben adaptarse a las distintas materias primas; así como a las variables de proceso, concentración y temperatura. De igual importancia es la domesticación de microorganismos que de manera natural son productores, pero no se logran controlar en proceso.
- vi. **Pruebas y mediciones.** Generalmente, en los diseños biológicos se requiere probar de manera rutinaria las capacidades y características de estos; es decir, los microorganismos y enzimas diseñadas. De esta manera se logra la optimización por medio de la comprensión del sistema. Actualmente, las técnicas de cuantificaciones han ido disminuyendo de precio, pero siguen siendo poco accesibles.

Características de la materia prima útil para los bioprocesos

El petróleo ha sido la principal materia prima para generar compuestos químicos —que son intermediarios en la elaboración de otros productos finales— en una gran variedad de industrias. Por mencionar algunas: la industria química, farmacéutica, de cosméticos, de plásticos y de electrónicos, entre otras. Fundamentalmente vivimos en una economía basada en el procesamiento del petróleo. La condición que ha preocupado en los últimos años es que éste es una materia prima no renovable; además, su uso está asociado a la emi-

sión de gases de efecto invernadero y, por consecuencia, se tienen los efectos ambientales del calentamiento global. Por lo tanto, se busca encontrar materias primas de carácter renovable, y provenientes de la biomasa vegetal (todo aquello que logra consumir CO_2). Actualmente, existen muchos procesos de la industria biotecnológica que ocupan azúcares como materias primas provenientes de la fijación de CO_2 ; por ejemplo, la glucosa se elabora a partir del jarabe de maíz, el cual fue obtenido como un producto del crecimiento de la planta y su posterior hidrólisis.

De esta manera, podemos establecer que si se conocen las alternativas renovables para sostener la actividad económica, pueden ser utilizadas. Hemos aprendido que la naturaleza tiene la capacidad de proveer material vegetal, el cual es de carácter renovable y accesible en todo el planeta; además de que contiene una gran diversidad de azúcares útiles para alimentar nuestros procesos. Por lo tanto, la biomasa vegetal, es uno de los mejores candidatos para lograr obtener las fuentes de carbono para alimentar los procesos que permitan sintetizar los materiales que utilizamos en la vida diaria. Ejemplos: los azúcares de seis carbonos (C6), tales como glucosa y fructosa; o de cinco carbonos (C5), como xilosa (figura 3.2) (Cherubini 2010, FitzPatrick, Champagne et al, 2010).

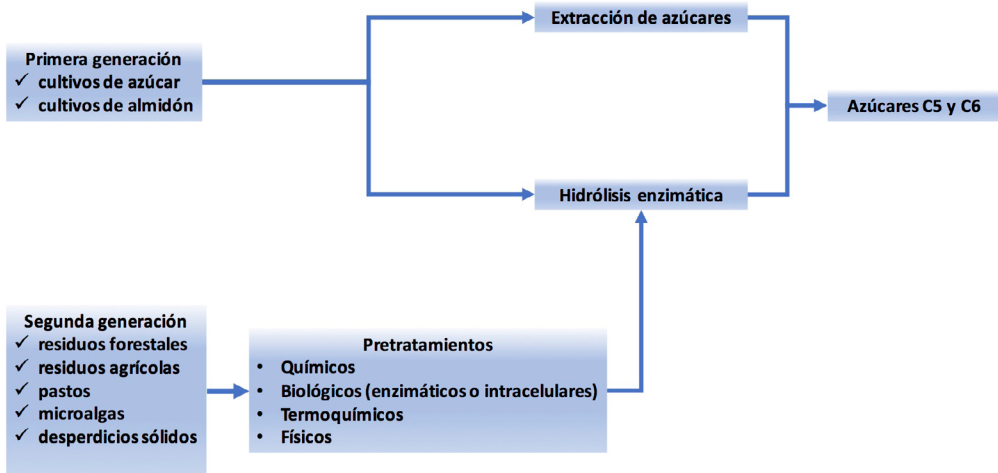


Figura 3.2. Las diferentes materias primas tienen como estructura principal azúcares de cinco y seis carbonos, usadas para alimentar los bioprocesos de producción.

Debe quedar claro que la biomasa vegetal hace referencia a aquellos materiales que son parte de un proceso renovable; por ejemplo: árboles, cultivos, granos, desechos de la

* Es necesario recalcar que el término biomasa también se utiliza en el contexto de las fermentaciones, refiriéndose a las células o microorganismos utilizados; por lo tanto, en ocasiones es necesario entender en qué contexto se utiliza el término.

agricultura, residuos de bosques, plantas acuáticas, microalgas y desperdicios de animales. A su vez, estos materiales se han clasificado en dos grandes grupos: i) materias primas de primera generación, las cuales provienen directamente de cultivos comestibles, como plantas ricas en contenido de almidón y aceite; y ii) las materias primas de segunda generación, las cuales se basan en residuos no-comestibles, ya sea provenientes de cultivos u otras fuentes (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Materias primas de biomasa vegetal usadas para alimentar los bioprocesos de producción.

Primera generación	
Materia prima	Características
Maíz Trigo	Ricos en almidones, los cuales pueden ser hidrolizados de forma enzimática, resultando soluciones de azúcar con la capacidad de ser utilizadas en los procesos de fermentación. Otra ventaja consiste en que se generan productos alternos ricos en proteínas y energía que se ocupan en alimento para ganado.
Soya Aceite de palma Jatrofa Aceite de canola	Se han utilizado para la generación de aceites, que luego se someten a un proceso de transesterificación o catálisis, para la producción de biodiesel, turbosina u olefinas (etileno y propileno).
Caña de azúcar Remolacha azucarera Sorgo dulce	Rica en sacarosa, funciona como una fuente de carbono directa para los procesos de fermentación.
Segunda generación	
Materia prima	Características
Pasto perenne Residuos agrícolas Sorgo híbrido Residuos forestales Cultivos de rápido crecimiento.	Pueden considerarse más económico comparados con los de primera generación. Pero su procesamiento para lograr extraer azúcares es más costoso.
Microalgas	Las microalgas presentan un potencial para la producción de aceites precursores de biodiesel. Pero también se explora como un microorganismo generador de otros productos.

La constante de las materias primas descritas en la tabla 3.1 es el contenido de fuentes de carbono útiles para alimentar los procesos de fermentación. A excepción de los casos de los aceites, los cuales alimentan procesos químicos principalmente.

La complejidad de procesar estos componentes primarios se debe esencialmente a su estructura polimérica, la cual debe romperse. La particularidad de las materias primas de segunda generación es: su alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Polímeros cuyas unidades se componen de azúcares fermentables y otras moléculas difíciles de procesar. La celulosa es: un polímero lineal compuesto por unidades de glucosa, las cuales son obtenidas por hidrólisis ácida o enzimática. En segundo lugar, se encuentra la hemicelulosa, la cual es: un polímero ramificado, y su hidrólisis es más compleja que la de la celulosa.

Para poder estimar la eficiencia de la materia prima en proveer de azúcares a los bioprocesos de producción, en la tabla 3.2 se presentan valores de algunos compuestos de biomasa vegetal de segunda generación (Sun & Cheng, 2002). Los registros varían en distintos rangos.

Tabla 3.2. Porcentajes de celulosa, hemicelulosa y lignina para algunos compuestos de biomasa vegetal de segunda generación (Sun & Cheng, 2002).

Material	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Algodón	80-95	0	0
Cascara de nuez	25-30	25-30	30-40
Desecho de papel de pulpeos	60-70	10-20	5-10
Desechos de cerdo	60-70	28	-
Desechos de pasto	25-40	35-40	18-30
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	-	24-29
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hojas	15-20	80-85	0
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Olote de maíz	45	35	15
Paja de trigo	30	50	15
Papel	85-99	0	0-15
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Pasto de crecimiento rápido	45-50	31.4	12

Agentes biológicos

Como agentes biológicos nos referiremos a todos esos componentes, u organismos, que están involucrados en la transformación de materia prima. Pueden ser parte de este, participando como responsables directos de la transformación de la materia prima, o como producto final. Estos comprenden: las enzimas, células (microbianas, mamíferas y vegetales), tejidos, además de organismos vivos como plantas y animales. Por lo tanto, es de importancia que el ingeniero biólogo comprenda los principios básicos del funcionamiento de estos agentes y conozca cuál es su potencial de aplicación.

Las enzimas son proteínas de alto peso molecular (cuyas unidades de medida son los Daltons, símbolo Da), que catalizan una gran diversidad de reacciones bioquímicas. Como catalizadores, tienen la función de incrementar la velocidad con la cual se transforman los productos y reactivos; esto es, permiten procesar con mayor rapidez una cantidad de éstos por unidad de tiempo, por unidad de catalizador, o volumen. En una bacteria como *Escherichia coli* se pueden encontrar hasta 2 000 tipos diferentes de enzimas, las cuales participan en distintos procesos celulares tales como: el metabolismo, replicación de ADN y síntesis de proteínas, entre otros. En resumen, las enzimas son los catalizadores de la vida. Pero también se pueden considerar como las impulsoras de la industria y la economía.

Las enzimas han estado involucradas en una gran cantidad de actividades humanas desde tiempos antiguos. Un ejemplo de estas aplicaciones es la producción de quesos, los cuales se elaboran de manera tradicional usando el contenido estomacal de los rumiantes como la vaca para llevar a cabo el paso de coagulación en el proceso de fabricación de este producto lácteo. En la actualidad, se tiene identificado que este contenido gástrico incluye la enzima quimosina, la cual es responsable del proceso de coagulación. Actualmente, esta enzima es la de mayor demanda para la elaboración de quesos y se obtiene sin la necesidad de utilizar el contenido estomacal del rumiante. Pero este no es el único caso, muchas otras industrias ocupan enzimas para la elaboración de diversos productos. En la tabla 3.3 se mencionan ejemplos de diferentes clases de enzimas que se utilizan en distintos segmentos industriales.

Tabla 3.3. Enzimas usadas en distintos segmentos industriales, adaptado de Kirk et al, (Kirk, Borchert et al, 2002).

Tipo de industria	Clase de enzima	Aplicación
Detergentes	Proteasas	Remoción de manchas de proteína
	Amilasas	Remoción de manchas de carbohidratos
	Celulasas	Remoción de manchas de lípidos
Almidón y combustibles	Amilasas	Sacarificación
	Glucosa isomerasas	Conversión de glucosa a fructosa
	Xilanasas	Reducción de viscosidad
Alimentos	Proteasas	Coagulación de leche, fórmulas lácteas para bebés
	Pectinasas	Procesamiento de productos de origen frutal
	Lactasas	Remoción de la lactosa en la leche
Horneado	Amilasas	Ablandamiento del pan y condicionamiento de volumen. Ajuste de la harina
	Xilanasas	Acondicionamiento de la mezcla de panificación
	Fosfolipasas Lipasas	Acondicionamiento y estabilidad de la mezcla de panificación
Alimento animal	Fitasas	Mejoramiento de la digestión del producto
	Xilanasas Glucanasas	Digestibilidad
	Acetolactato descarboxilasas	Maduración de cerveza
Bebidas	Lacasas	Clarificación de jugos, rectificación de sabor de la cerveza
	Pectinasas	Modificación de la viscosidad del jugo
	Pectato liasas	Fregado del textil
Textiles	Lacasas	Blanqueado
	Peroxidasas	Remoción del exceso de tinte
	Celulasas	Modificación de fibras
Pulpa y papel	Proteasas	Remoción de biopelículas
	Lipasas	Control de contaminantes
	Lipasas	Transesterificación
Grasas y aceites	Fosfolipasas	Desgomado
	Penicilin acilasas	Síntesis de penicilina semisintética
	Nitrilasas	Síntesis de enantiómeros puros de ácidos carboxílicos
Síntesis orgánica	Lipasas	Separación de mezclas racémicas alcoholes y amidas quirales
	Proteasas	Suavizar el cuero
	Lipasas	Desengrasado de la piel
Cuero	Amiloglucosidasas Glucosa oxidadasas Peroxidasas	Antimicrobianos

A diferencia de las enzimas, las cuales se introducen al proceso en cantidades definidas, los microorganismos y células mamíferas o vegetales pueden generarse dentro del proceso. Estos agentes biológicos pueden expandir las posibilidades de aplicación gracias a las nuevas tecnologías de ADN recombinante, con las cuales es posible manipularlos genéticamente para adaptarlos a nuevos procesos.

La manera en la que se eligen los microorganismos aptos para un proceso de producción ha ido cambiando con el tiempo. Originalmente, se les aislaba separándolos de los nichos ecológicos donde se encontraban; por ejemplo, en algún alimento o fermentado, generando lo que se conocía como un cultivo puro. Se evaluaba su capacidad productora y se seleccionaban las mejores cepas. De manera alternativa, las líneas escogidas se sometían a procesos de mejora por medio de mutagénesis o utilizando distintas condiciones de cultivo para perfeccionar sus propiedades de uso industrial. Actualmente, se hace uso extensivo de las tecnologías de ADN recombinante para poder mejorar las cualidades productoras de las cepas.

Algunas de las características más importantes de las células y microorganismos para ser utilizados en los bioprocesos son:

- Deben ser genéticamente estables, tanto para el almacenamiento como durante el periodo de proceso. En tiempos largos de realización de este, pueden generarse mutaciones o pérdida de las funciones celulares que afecten la productividad.
- Facilidad para manipularlos genéticamente. No siempre es posible hacerlo con las herramientas que se tienen actualmente.
- Que se puedan cultivar de manera sencilla en los distintos equipos de fermentación.
- Velocidades de crecimiento altas para lograr mayor productividad. Principalmente cuando la elaboración del producto que se quiere obtener viene asociada a la velocidad de crecimiento.
- Poder crecer en medios de cultivo con costo reducido. Se trata de eliminar la necesidad de sustratos que generalmente pueden ser más costosos que el producto que se quiere obtener; por ejemplo, vitaminas o inductores que afecten la expresión genética.
- Que logren generar un alto rendimiento del producto y fácil recuperación del medio de cultivo.
- Tener tolerancia a condiciones de estrés: pH y temperaturas altas, concentraciones elevadas de producto o sustrato.
- Deben ser seguros (no patógenos) y que no generen productos tóxicos de manera alterna al producto que se requiere.

Los casos de la producción de biocombustibles o insulina con microorganismos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son ampliamente conocidos (Quianzon & Cheikh, 2012). Por lo que en la tabla 3.4 se escriben algunos ejemplos de agentes biológicos utilizados para la producción de distintos productos no comúnmente conocidos (Zhang 2010, Ochoa-Villarreal, Howat et al, 2016).

Tabla 3. 4. Ejemplos de distintos productos y los agentes biológicos empleados para producirlos.

Agente biológico	Productos	Compañía	Comentarios
<i>Taxus spp.</i>	Paclitaxel	Python Biotech	Anticancer
<i>Podophyllum spp.</i>	Podophyllotoxin	Nippon Oil	Anticancer
Células de zanahoria en suspensión	Glucocerebrosidasa de humano	Protalix Bio Therapeutics	Tratamiento de la enfermedad de Gaucher
CHO (<i>chinese hamster ovary cell</i> , siglas en inglés)	1. Avastin 2. Simponi	1. Genentech 2. Centocor	1. Tratamiento de cáncer de colon 2. Tratamiento de artritis reumatoide
Sp2/0 (células de mieloma)	Stelara	Centocor	Psoriasis (enfermedad inflamatoria)
<i>E coli.</i>	1.Cimzia 2.Lucentis 3. 1,3 propanodiol	1.UCB-Celltech 2.Genentech 3. DuPont Tate & Lyle	1. Tratamiento de artritis reumatoide 2. Degeneración macular 3. Monómero para la producción de tereftalato de politimetileno (PPT)
<i>Lactobacillus</i>	ácido poliláctico	NatureWorks	Para producción de poliéster
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	polietileno	Metabolix	Producción de poliésteres

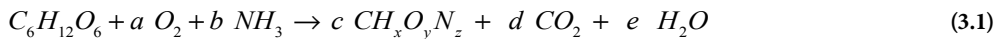
Finalmente, en este capítulo se presentan una serie de problemas que ofrecen al ingeniero biólogo un panorama de los conocimientos necesarios para el diseño y desarrollo de bioprocesos. Se presentan problemas que ocupan del conocimiento de los balances de materia y energía, transferencia de calor y masa, cuantificación de costos de proceso y aspectos de innovación y consultoría para el desarrollo de procesos.

Problema 3.1 Estequiometría del crecimiento de un microorganismo en condiciones aerobias

Juan Gabriel Viguera Ramírez

Introducción

Un análisis elemental determinó que la biomasa de *Leucoagaricus gongylophorus* tiene: 47.2% de C, 11% de N, 34.6% de O y 7.2% de H. A partir de estos datos, determine los coeficientes estequiométricos que faltan en la ecuación que definen el crecimiento aerobio con glucosa de este hongo.



R1:

$$47.2 \% (p/p) \text{ de } C \Rightarrow \left(\frac{47.2 \text{ g } C}{100 \text{ g de } CH_xO_yN_z} \right) \quad (3.2)$$

Por lo tanto, en 100 g de $CH_xO_yN_z$ tenemos:

$$47.2 \text{ g } C \left(\frac{\text{mol}}{12 \text{ g } C} \right) = 3.933 \text{ mol } C \quad (3.3)$$

$$11 \text{ g } N \left(\frac{\text{mol}}{14 \text{ g } N} \right) = 0.785 \text{ mol } N \quad (3.4)$$

$$34.6 \text{ g } O \left(\frac{\text{mol}}{16 \text{ g } O} \right) = 2.1625 \text{ mol } O \quad (3.5)$$

$$7.2 \text{ g } H \left(\frac{\text{mol}}{1 \text{ g } H} \right) = 7.2 \text{ mol } H \quad (3.6)$$

La fórmula empírica de la biomasa microbiana, se expresa por convención en función de un único átomo de carbono, por lo tanto, la proporción elemental es:

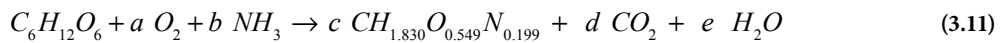
$$C = \left(\frac{3.933 \text{ mol C}}{3.933 \text{ mol C}} \right) = 1 \quad (3.7)$$

$$N = \left(\frac{0.785 \text{ mol N}}{3.933 \text{ mol C}} \right) = 0.199 \quad (3.8)$$

$$O = \left(\frac{2.1625 \text{ mol O}}{3.933 \text{ mol C}} \right) = 0.549 \quad (3.9)$$

$$H = \left(\frac{7.2 \text{ mol H}}{3.933 \text{ mol C}} \right) = 1.830 \quad (3.10)$$

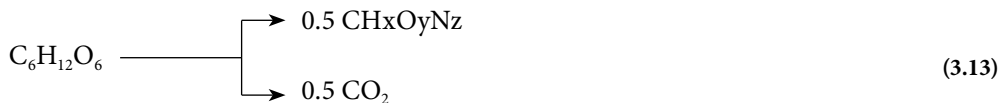
Por lo tanto, la fórmula empírica de *Leucoagaricus gongylophorus* que define su crecimiento con glucosa es: $CH_{1.830}O_{0.549}N_{0.199}$



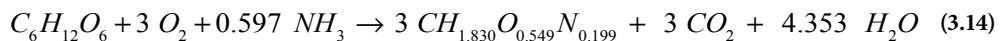
Considerando que el coeficiente respiratorio (CR) para la oxidación de carbohidratos es 1, tenemos:

$$CR = \left(\frac{d CO_2}{e O_2} \right) = 1 \quad (3.12)$$

Además, en condiciones aerobias $Y_{x/S} = 0.5$



De ahí, la ecuación queda como sigue:



Problema 3.2 Formulación de un medio de cultivo

Rodolfo Quintero Ramírez

Introducción

Los antibióticos son productos biotecnológicos que han transformado la terapéutica a nivel mundial desde los años cuarenta del siglo pasado, y sin duda han contribuido a disminuir sustancialmente las muertes por infecciones.

La historia del descubrimiento de la penicilina por el Dr. A. Fleming es conocida por muchos, así como su posterior transformación en el primer antibiótico producido por fermentación aeróbica; éstos son, sin duda, hitos en el desarrollo biotecnológico mundial. Además, en este caso quienes lo hicieron posible, o encabezaron el grupo de investigación responsable, se les concedió el Premio Nobel: Dres. A. Fleming, E. B. Chain y H. W. Florey.

Entre los miles de antibióticos que han sido descritos en textos científicos, destaca de manera primordial la penicilina G ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$, 334.4 g/mol) (figura 3.3).

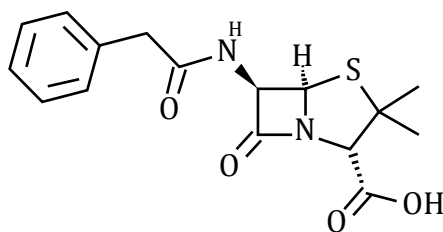


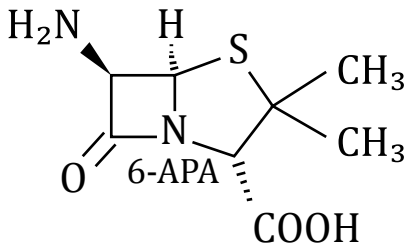
Figura 3.3. Estructura molecular de la Penicilina G.

Presenta las siguientes características:

- Fue el primer antibiótico producido masivamente y que tuvo un gran éxito a nivel terapéutico.
- A partir de su estructura básica, el ácido 6 aminopenicilánico (6-APA), se han obtenido, tanto por vía química como enzimática, varios antibióticos de

segunda, tercera y hasta sexta generación lo que ha prolongado su importancia e impacto (figura 3.4).

- En los últimos años la penicilina también ha tenido un gran uso e impacto en el sector pecuario, utilizándose rutinariamente en diversos tipos de ganado.
- Su versatilidad química ha permitido contrarrestar, aunque sea parcialmente, la aparición de bacterias resistentes.



Penicilinas semisintéticas:

- Ampicilina
- Amoxicilina
- Oxacilina
- Dicloxicilina
- Piperacilina

Figura 3.4. El ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) es un precursor para la elaboración de penicilinas semisintéticas.

En el problema que se plantea a continuación, se expone un caso típico de actividad profesional de un ingeniero biológico relacionado con la producción de penicilina.

Problema

Se desea producir Penicilina G (Pen G) en un tanque de fermentación de 50 000 galones, con una nueva cepa de *Penicillium chrysogenum* que alcanza un título de 60 000 Unidades Oxford/ml en 6 días.

Para el medio de cultivo, de acuerdo a la tecnología adquirida, se tiene lo siguiente:

- Se debe añadir ácido fenilacético como precursor del producto.
- La fuente principal de C es una solución de dextrosa denominada Staleydex.
- La fuente principal de N es Pharmamedia.
- Se supone que la concentración final de la biomasa es de 50 g/L y que el 20% del antibiótico se descompone entre la recuperación y la purificación.

La tarea es formular un medio de cultivo adecuado para esta fermentación.

Los datos técnicos de la fermentación son:

- Estequiometría: 3 glucosa + 3 NH₃ + H₂SO₄ + Ácido fenilacético → Pen G.
- La eficiencia estequiométrica es de 90%.
- La duración de la fermentación es de seis días, dividida en dos fases: en la primera, de un día, el hongo crece; durante la segunda, de cinco días, se produce la mayor parte de la penicilina, por tratarse de un metabolito secundario.
- El Y_s = 0.45 g/g glucosa
- Energía de mantenimiento 0.027 g glucosa / g biomasa · h
- 1 Unidad Oxford equivale a 0.6 µg PenG

Procedimiento

Calcular el rendimiento teórico de conversión de penicilina a partir de ácido fenilacético (AF).

$$Y_p = \frac{1 \text{ mol Pen G}}{1 \text{ mol AF}} \cdot 372 \frac{\text{g PenG}}{\text{mol PenG}} \cdot \frac{1}{136 \frac{\text{gAF}}{\text{mol AF}}} \quad (3.15)$$

$$Y_p = 2.7 \frac{\text{g Pen G}}{\text{g AF}} \quad (3.16)$$

Siendo que se alcanza sólo el 90% del valor teórico, entonces:

$$Y_p = 2.7 \frac{\text{g Pen G}}{\text{g AF}} \cdot (0.9) \quad (3.17)$$

$$Y_p = 2.7 \frac{\text{g Pen G}}{\text{g AF}} \quad (3.18)$$

Ahora se debe considerar la parte que se pierde en la recuperación y transformar las Unidades Oxford a masa:

$$P = \frac{60\,000 \text{ U}}{\text{ml}} \cdot \frac{0.6 \mu\text{g PenG}}{1\text{U}} \cdot \frac{10^3 \text{ ml}}{\text{L}} \cdot \frac{10^{-6} \text{ g PenG}}{\mu \text{ g PenG}} \cdot \frac{1}{0.8} = 45 \frac{\text{g PenG}}{\text{L}} \quad (3.19)$$

Se supone que al principio de la fermentación no hay Pen G presente, y todo el AF (ácido fenilacético) se consume, por lo tanto, los valores al inicio son:

$$P_0 = 0 \quad (3.20)$$

$$S_0 = \frac{P}{Y_p} = 45 \frac{\text{g Pen G}}{L} \cdot \frac{1}{2.5 \frac{\text{PenG}}{\text{g AF}}} = 18 \frac{\text{g AF}}{L} \quad (3.21)$$

La descripción del crecimiento celular se obtiene de:

$$-\frac{dS}{dt} = m_s \cdot X + \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad (3.22)$$

Donde m_s , es la energía de mantenimiento. Integrando la ecuación:

$$S_0 - S = m_s \int_0^t X dt + \frac{1}{Y} (X - X_0) \quad (3.23)$$

De acuerdo con los datos proporcionados:

En un día se alcanza la mayor parte de la biomasa y la energía de mantenimiento es despreciable, entonces:

$$S_0 - S = \frac{1}{Y} (X - X_0) \quad (3.24)$$

El inóculo se supone igual a cero, $X_0 = 0$, pero en realidad sería entre 1 y 3% (en algunos casos hasta 10%) y S es cero (todo se realiza en formar biomasa):

$$S_0 = \frac{X}{Y} = \frac{50 \text{ g/l}}{0.45 \text{ g/g glucosa}} = \frac{111 \text{ g glucosa}}{L} \quad (3.25)$$

En los siguientes cinco días de la fermentación el crecimiento es lento y la mayor parte de la fuente de C se utiliza para mantenimiento (m_s):

$$S_0 = m_s t = \frac{0.027 \text{ g glucosa}}{\text{g biomasa} \cdot \text{h}} \cdot \frac{50 \text{ g}}{L} \cdot 5 \text{ días} \cdot \frac{24 \text{ h}}{\text{días}} = 161 \frac{\text{g glucosa}}{L} \quad (3.26)$$

La fuente de C para la penicilina se calcula como sigue: si solo se alcanza el 90% del rendimiento estequiométrico teórico, entonces primero se estima el Y_p teórico (Y_p^*) después el Y real:

$$Y_p^* = \frac{1 \text{ mol PenG}}{3 \text{ mol glucosa}} \cdot \frac{372 \text{ s PenG/mol PenG}}{180 \text{ g glucosa/mol glucosa}} \quad (3.27)$$

$$Y_p^* = 0.69 \frac{g \text{ PenG}}{g \text{ glucosa}} \quad (3.28)$$

Y el Y_p real es,

$$Y_p = 0.9 \cdot Y_p^* \cdot \frac{0.62 g \text{ PenG}}{g \text{ glucosa}} \quad (3.29)$$

Para calcular la glucosa que se requiere para la síntesis de Pen G, debe considerarse que se trata de un metabolito secundario, por tanto:

$$\frac{dp}{dt} = - Y_p \frac{dS}{dt} \quad (3.30)$$

Integrando:

$$P - P_0 = - Y_p (S_0 - S) \quad (3.31)$$

Suponiendo que P_0 es cero y que toda la glucosa se consume $S = 0$, entonces:

$$S_0 = \frac{P}{Y_p} = \frac{45 g \text{ PenG} / L}{0.62 g \text{ PenG} / g \text{ glucosa}} = 72 \frac{g \text{ glucosa}}{L} \quad (3.32)$$

Por tanto, la cantidad de glucosa que se requiere en el medio de cultivo es:

$$S_0 = 111 \frac{g \text{ glucosa}}{L} + 161 \frac{g \text{ glucosa}}{L} + 72 \frac{g \text{ glucosa}}{L} = 345 \frac{g \text{ glucosa}}{L} \quad (3.33)$$

De acuerdo al proveedor de Staleydex, la dextrosa líquida está al 70%, y la composición reportada de Pharmamedia es que contiene un 24.13% de carbohidratos.

Por tanto, el C requerido será aportado por la dextrosa de Staleydex (W_1) y Pharmamedia (W_2).

$$0.7 W_1 + 0.24 W_2 = 345 \frac{g \text{ glucosa}}{L} \quad (3.34)$$

Para resolver esta expresión matemática se requiere hacer uso de otra ecuación para el balance de N.

Primero se estima el requerimiento de N para la biomasa, después el N que se requiere para la Pen G.

De acuerdo a la literatura, el % de N en hongos es de 6% (rango 4 – 7%) por lo tanto:

$$50 \frac{\text{g biomasa}}{\text{L}} \cdot 0.06 \frac{\text{g N}}{\text{g biomasa}} = 3.0 \frac{\text{g N}}{\text{L}} \quad (3.35)$$

La Pen G tiene la siguiente fórmula $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$, por lo tanto la cantidad de nitrógeno requerida se calcula como:

$$45 \frac{\text{PenG}}{\text{L}} \cdot 0.075 \frac{\text{g N}}{\text{g PenG}} = 3.40 \frac{\text{gN}}{\text{L}}$$

El nitrógeno total requerido es:

$$3.0 \frac{\text{g N}}{\text{L}} (\text{para biomasa}) + 3.4 \frac{\text{g N}}{\text{L}} (\text{para penicilina}) = 6.40 \frac{\text{g N}}{\text{L}} \quad (3.36)$$

El N será aportado por Pharmamedia, el cual contiene, de acuerdo al catálogo: un 59% de proteína o sea (N) $(6.25) = 0.59$, de lo que se estima que el 16% de la proteína es N; el Staleydex no contiene N.

$$(0.16)(0.59)W_2 = 6.40 \frac{\text{g N}}{\text{L}} \quad (3.37)$$

Ahora se puede resolver el sistema de ecuaciones simultáneas:

$$\begin{aligned} 0.7 W_1 + 0.24 W_2 &= 345 \frac{\text{g glucosa}}{\text{L}} \\ (0.16)(0.59)W_2 &= 6.40 \frac{\text{g N}}{\text{L}} \end{aligned} \quad (3.38)$$

Para terminar de calcular el medio de cultivo, debemos estimar la cantidad de sustrato que se requiere considerando W es g/L y C el contenido del compuesto (%):

$$W_1 = 469.43 \frac{\text{g Staleydex}}{\text{L}} \quad (3.39)$$

$$W_2 = 67.80 \frac{\text{g Pharmapedia}}{\text{L}} \quad (3.40)$$

Haciendo el balance,

$$W_1 C_1 + W_2 C_2 + W_3 C_3 + W_4 C_4 = W_5 C_5 + W_6 C_6 \quad (3.41)$$

En donde,

$$W_1 = 469.43 \frac{\text{g Staleydex}}{\text{L}}, C_1 = 0$$

$$W_2 = 469.43 \frac{\text{g Pharmamedia}}{\text{L}} C_2 = 1.8 \% \text{ como } SO_2 = 0.6\% \text{ como S}$$

$$W_3 = 18 \frac{\text{g FA}}{\text{L}}, C_3 = 0$$

$$W_4 = \frac{\text{Fuente de S (H}_2\text{SO}_4\text{)}}{\text{L}}, C_4 = 98 \% , H_2SO_4 = 32 \% \text{ como S}$$

$$W_5 = 50 \frac{\text{g}}{\text{L}}, C_5 = 0.5 \%$$

$$W_6 = 45 \frac{\text{g PenG}}{\text{L}}, C_6 = 8.6 \%$$

Por lo tanto, sustituyendo:

$$67.80 (0.006) + W_4 (0.32) = 50(0.005) + 45(0.086) \quad (3.42)$$

$$\text{Resolviendo: } W_4 = 9.1 \frac{\text{g H}_2\text{SO}_4}{\text{L}}$$

Se puede continuar el análisis por balances similares para P, K, Mg, Na, Ca, Fe. Los resultados se resumen en la tabla 3.5.

Componentes Medio de Cultivo:

$$\text{Staleydex} = 469.43 \text{ g/L}$$

$$\text{Pharmamedia} = 67.80 \text{ g/L}$$

$$\text{Ácido fenilacético} = 18 \text{ g/L}$$

$$H_2SO_4 = 9.1 \text{ g/L}$$

El único que aporta estos nutrientes es Pharmamedia.

Tabla 3.5. Resultados del porcentaje de elementos requeridos en biomasa para la producción de penicilina G (Pen G).

Elemento	Compensación %		Pharmamedia
	Biomasa	Penicilina G	
C	48	51.6	45
N	6.0	7.5	9.5
S	0.5	8.6	0.6
P	4.5	0	1.31
K	2.5	10.5	1.72
Mg	0.3	0	0.736
Na	0.5	0	0.0031
Ca	1.4	0	0.2530
Fe	0.2	0	0.0094

Para P, Pharmamedia aporta $68.32 (0.131) = 0.895$ g/L y se requiere, para biomasa $50 (0.45) = 2.25$ gP/L y para Pen G = 0; por lo que hay un déficit de 1.355 g P/L

Para K, (se hace un balance semejante) $68.32 (0.0172) = 50 (0.025) + 45 (0.105)$, se observa que en este elemento también hay un déficit de 4.331 g/L: por lo que otra fuente debe adicionarse (generalmente soluciones acuosas de diferentes sales).

Para otros elementos, los resultados se muestran en la tabla 3.6:

Tabla 3.6. Resultados del porcentaje de resto de los elementos requeridos en biomasa para la producción de penicilina G (Pen G)

Elemento	Pharmamedia	Requisitos (g/l) Biomasa	Déficit
Mg	50.284	0.15	---
Na	0.212	0.25	0.389/l
Ca	17.285	0.7	---
Fe	0.642	0.1	---

Se observa que solamente hay un déficit de sodio, de tal manera que es necesario agregar una solución con las sales de este elemento y potasio en la concentración adecuada, para subsanar el déficit.

Para terminar el problema, se debe considerar que el tanque de fermentación de 50 000 gal sólo opera al 75% de su capacidad, por lo que hay que preparar 141 937.5 litros de medio de cultivo.

Cuando se formula un medio de cultivo, generalmente se empieza por seleccionar las materias primas (diferentes fuentes de nutrientes) para cada uno de los elementos básicos y después se optimiza, variando la composición.

Por ejemplo: si son tres los componentes del medio que se desea optimizar (ABC), entonces se hacen ocho experimentos donde se sigue el siguiente esquema (tabla 3.7):

Tabla 3.7. Se muestran las posibles combinaciones de los componentes a elegir para la formulación de un medio de cultivo

	A	B	C
1	+	+	+
2	-	+	+
3	+	-	+
4	+	+	-
5	-	-	+
6	-	+	-
7	+	-	-
8	-	-	-

Donde: el signo (+) significa que a la composición base se le agrega una concentración mayor de la fuente del elemento, y (-) significa que la concentración de la fuente de ese elemento que se pone, es inferior de la composición base.

Problema 3.3 Balance de materia en un proceso de producción de café descafeinado

Adela Irmene Ortíz López

Introducción

Los balances de materia y energía son indispensables en cualquier área de la ingeniería de procesos. Son las primeras herramientas que tiene un ingeniero biológico para abordar problemas relacionados con el diseño de procesos y bioprocesos.

Los balances de materia y energía permiten la aplicación de las leyes de conservación de materia y energía, respectivamente. Es decir, aplicar a un sistema el principio de que: “la materia no se crea ni se destruye solo se transforma”, y “la energía de un sistema y sus alrededores no puede crearse ni destruirse”. En otras palabras, la cantidad neta de energía ganada por un sistema es igual a la energía que pierden los alrededores. Estos conceptos son fáciles de entender, pero su aplicación, es decir los balances, requieren de la integración de conceptos diversos de química, física y matemáticas; así como, de termodinámica y fisicoquímica.

En este problema, se presenta una metodología para el planteamiento y resolución de los balances de materia para un proceso industrial de producción de café descafeinado, mediante balances sin reacción en estado estacionario. Mientras que, en el siguiente, se exponen además los balances de energía asociados al mismo procedimiento, pero en sistemas con y sin reacción en estado estacionario.

La metodología para la resolución de balances de materia y energía fue adaptada de dos libros fundamentales para hacer balances de materia y energía (Himmelblau & Huerta, 1988; Felder & Rousseau, 2006) y consiste en:

- i. Leer cuidadosamente la descripción del sistema, entender el enunciado del problema, comprender la física y química del proceso, e identificar las preguntas que hay que responder. Cuando sea necesario, buscar información adicional.
- ii. El alumno debe traducir dicha información a un diagrama de bloques del proceso, especificando claramente las fronteras.
- iii. Etiquetar todas las corrientes del proceso, incluyendo todos los datos conocidos y desconocidos. Nombrar variables para los que no se conozcan (incluyendo

- unidades). Indicar las condiciones de presión, temperatura y estado de agregación de cada corriente o componente del sistema.
- Incluir también las relaciones o especificaciones entre las variables.
 - Identificar o proponer una base de cálculo.
- iv. Realizar el análisis de grados de libertad. Si el sistema tiene cero grados de libertad proceder al paso 5). De otra manera buscar si hay datos que no estén incluidos en el diagrama.
 - v. Plantear y simplificar la(s) ecuación(es) de balance(s) de materia y energía. Indicando claramente las suposiciones realizadas.
 - vi. Establecer estados de referencia para el cálculo de los valores de entalpías y realizar las estimaciones.
 - vii. Identificar el sistema de ecuaciones a resolver.
 - viii. Establecer una estrategia de solución del sistema de ecuaciones.
 - ix. Resolver las ecuaciones (puede incluir la ayuda de software).
 - x. Verificación de resultados que incluye responder las preguntas que indica el enunciado del problema, así como la validación numérica y lógica de los resultados.

Contexto de la producción del café descafeinado

De acuerdo a la Organización Internacional del Café (OIC), el consumo anual de café en el mundo en 2015 fue de alrededor de 9 millones de toneladas (149.3 millones de sacos) (Organización internacional del café, 2015). El café descafeinado es grano verde al que se le ha eliminado la mayor parte de la cafeína (>95%), representa entre el 8 y 9% de dicho consumo. La reducción en el contenido de cafeína se consigue mediante un proceso de extracción que mantiene las condiciones organolépticas de la materia prima dentro de un rango especificado.

Su proceso de producción consiste en una serie de etapas: 1) Pretratamiento de los granos verdes de café (sin tostar) con agua o vapor para facilitar la eliminación de la cafeína; 2) Extracción sólido-líquido de la cafeína del grano; 3) Recuperación de solventes o regeneración de adsorbentes; 4) Secado del grano descafeinado hasta que recupere su contenido normal de humedad; y 5) Tostado, para obtener el producto final que son precisamente granos tostados descafeinados. Los procesos industriales más comunes para la extracción utilizan solventes orgánicos como el acetato de etilo y diclorometano (DCM), mientras que otros utilizan agua como solvente o fluidos supercríticos principalmente CO₂.

La extracción sólido-líquido es: una operación unitaria de transferencia de materia, que consiste en extraer, mediante la disolución en un solvente, uno o más solutos (sólidos o líquidos) contenidos en un sólido inerte.

Enunciado del problema

Un proceso comercial de producción de café descafeinado utiliza extracción con DCM para la separación de los componentes. En una primera etapa de pretratamiento, se alimenta vapor saturado producido para entrar en contacto con los granos de café verde cuyo contenido (en masa) de cafeína es del 2.3% y 11% de agua. Este proceso sirve para humectar el café facilitando la extracción de la cafeína. Se utiliza una relación de granos y vapor de 1 a 1.25 en masa. Estos al final de este proceso contienen 45% de agua. El exceso de vapor (agua no absorbida por los granos) se condensa y se reusa en otras áreas de la planta. Los granos de café humectados, pasan al sistema de extracción sólido-líquido por contacto, utilizando DCM como solvente en condiciones de temperatura, presión y tiempo de contacto, cuidadosamente controladas. Por cada tonelada de granos de café verde se utilizan 10 kg de DCM. De este proceso se obtienen dos corrientes: 1) el extracto que contiene 1.8% en peso de cafeína y, 2) el residuo sólido de la extracción (granos de café verde húmedos descafeinados), que contiene 6 226 ppm de DCM. El extracto pasa a un separador donde el DCM (CH_2Cl_2) se evapora y condensa para recircularlo, mezclándolo con la corriente de alimentación fresca de solvente antes de entrar al proceso de extracción. Mientras que la cafeína recuperada se seca y se comercializa como materia prima para fabricación de bebidas energizantes.

Los granos de café descafeinados pasan a un secador donde se eliminan los excesos de solvente y agua para obtener el producto final que son precisamente los granos de café verde descafeinado. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NMX-F-552-1998), los contenidos máximos de cafeína, humedad y solvente deben ser de: 0.12%, 12.5% y 10 ppm, respectivamente. Los vapores de DCM, así como el agua de salida de este proceso, se condensan y tratan para no emitir vapores contaminantes a la atmósfera.

Si se procesan 500 kg/h de café verde, donde el proceso de secado permite eliminar el 99.999% del DCM, y el 85% del agua, calcule:

- i. La cantidad de café verde descafeinado que se produce por hora.
- ii. La cantidad de cafeína seca que se produce por hora.
- iii. La relación entre flujo de DCM recirculado y flujo de alimentación fresca en el proceso de extracción.
- iv. De acuerdo a las condiciones especificadas, indicar si el café verde descafeinado producido cumple con las normas señaladas en la NOM NMX-F-552-1998, respecto al contenido de DCM, humedad y cafeína.
- v. ¿Cuál es la eficiencia de extracción de la cafeína?

Paso 1. Descripción y clasificación del proceso

Se trata de un sistema con varias unidades (sistemas) sin reacción: humectación (pretratamiento), extracción, evaporación y secado. Es un proceso continuo y se asume en estado estacionario, es decir, los flujos del sistema son constantes con respecto al tiempo.

Paso 2. Diagrama del proceso

Con toda la información descrita anteriormente, se elabora el diagrama del proceso, que se presenta en la figura 3.5.

Analizando las preguntas que fueron planteadas y el diagrama del proceso (figura 3.5), encontramos que la primera pide calcular la cantidad de café verde descafeinado que se produce por hora, es decir, lo que llamamos \dot{m}_{10} . La segunda pregunta pide calcular la cantidad de cafeína seca que se produce por hora, es decir, lo que llamamos \dot{m}_8 . Mientras que la tercera pide estimar la relación entre el flujo de DCM recirculado \dot{m}_7 y el de alimentación fresca en el proceso de extracción \dot{m}_9 . Finalmente, se pide comprobar que el café verde en grano descafeinado producido cumpla con las especificaciones NOM NMX-F-552-1998, respecto al contenido de DCM, humedad y cafeína; es decir, la composición del flujo \dot{m}_{10} . Mientras que para calcular la eficiencia de la extracción se necesita saber la cantidad de cafeína extraída (\dot{m}_8). Para responder estas preguntas, se deben resolver los balances alrededor de la unidad de secado y de evaporación o el punto de mezclado. El análisis de grados de libertad nos indicará si se cuenta con suficiente información para resolver dichos balances.

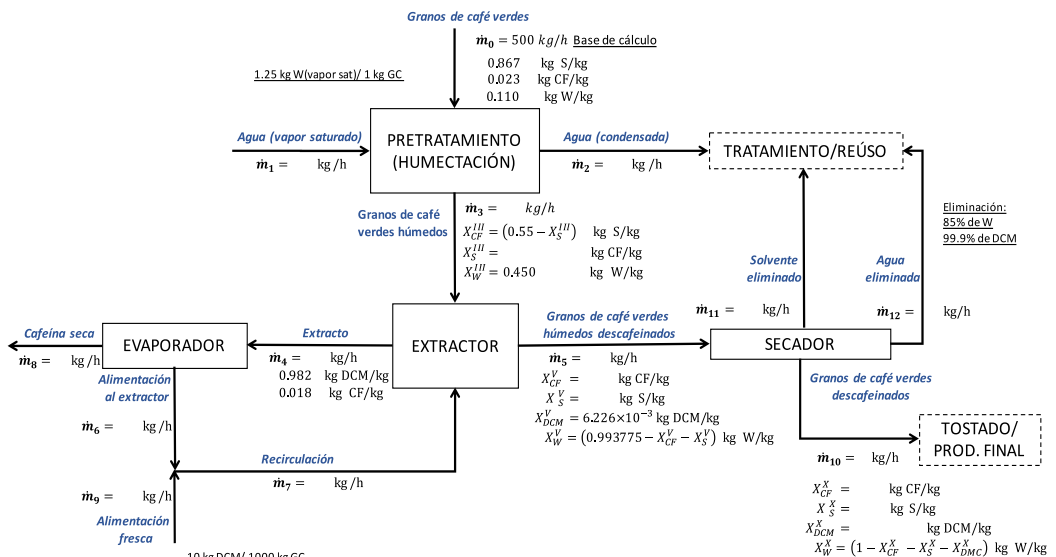


Figura 3.5. Diagrama del proceso. Donde: CF – cafeína; GC - Granos de café; S - sólidos no solubles/extraíbles; W - agua; DCM - diclorometano. Las composiciones de las corrientes se escribieron teniendo en cuenta que la suma de todas las fracciones debe ser igual a uno.

Paso 3. Análisis de grados de libertad (AGL)

El análisis de grados de libertad se realiza fijando fronteras para cada unidad donde es posible realizar balances de materia mediante el análisis de los flujos de entrada y salida, así como sus componentes. De cada una de ellas se contabiliza: 1) el número de variables desconocidas; 2) el número de ecuaciones de balances de materia independientes que se pueden escribir (uno para cada componente); 3) el número de relaciones o datos adicionales entre variables. Además de los balances por componente en cada sistema, se puede escribir un balance global de masa: sin embargo, este no es independiente ya que se puede obtener a partir de la suma de los balances por componente.

La figura 3.6 muestra las fronteras para el sistema del extractor y el compuesto por el extractor-evaporador. La delimitación de éstas en los sistemas permite identificar los flujos de entrada y salida de los diferentes procesos para la realización del análisis de grados de libertad.

El análisis de grados de libertad se muestra en la tabla 3.7 para todos los sistemas del proceso. De dicho estudio se concluye que: ni la unidad de secado, ni la de evaporación tienen solución, ya que los grados de libertad no son cero, los valores son positivos, lo cual quiere decir que se tienen más incógnitas que ecuaciones (balances y relaciones); por lo tanto, se requiere de más información para resolverlos y poder responder las preguntas planteadas. Mientras que el único sistema que tiene solución es el pretratamiento, es decir, el número de incógnitas que se tienen es igual al número de ecuaciones que se pueden plantear.

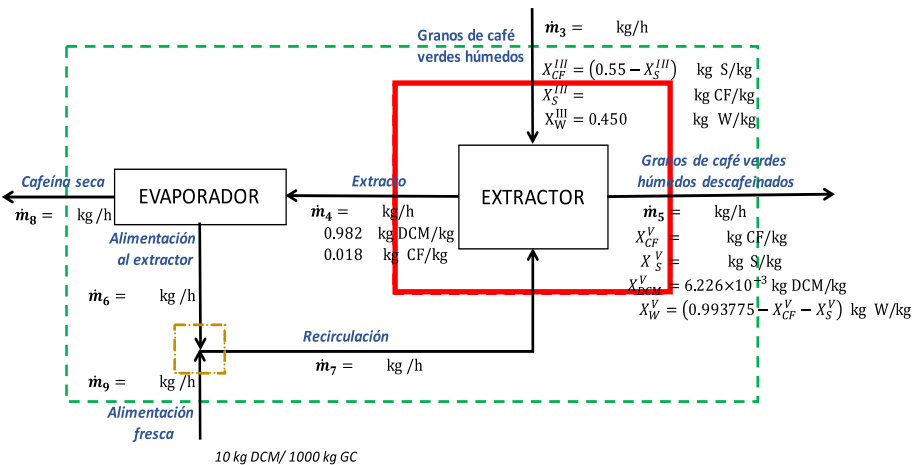


Figura 3.6. Fronteras de los sistemas de extracción (—); del sistema extractor-evaporador (- - -) y; del Punto de mezclado (- · - · -).

Tabla 3.7. Análisis de grados de libertad del sistema y los subsistemas.

Unidad/ Parámetros	Pretratamiento		Extractor		Evaporador		Extractor/ Evaporador	
	Descripción	#	Descripción	#	Descripción	#	Descripción	#
Incógnitas	$\dot{m}_1, \dot{m}_2, \dot{m}_3, X_S^{III}$	4	$\dot{m}_3, X_S^{III}, \dot{m}_4, \dot{m}_6, \dot{m}_5, X_{CF}^V, X_S^V$	7	$\dot{m}_4, \dot{m}_8, \dot{m}_7$	3	$\dot{m}_3, X_S^{III}, \dot{m}_8, \dot{m}_9, \dot{m}_5, X_{CF}^V, X_S^V$	7
Balances de materia	CF, S, W	3	CF, S, W, CDM	4	CF, DCM	2	CF, S, W, DCM	4
Relaciones entre variables	GC y vapor (\dot{m}_0 y \dot{m}_1)	1	-	0	-	0	Solvente y GC (\dot{m}_0 y \dot{m}_9)	1
Grados de libertad	$GL = 4 - 3 - 1$	0	$GL = 7 - 4$	3	$GL = 3 - 2$	1	$GL = 7 - 4 - 1$	2
Unidad/ Parámetros	Secador		Punto de Mezclado		GLOBAL			
	Descripción	#	Descripción	#	Descripción		#	
Incógnitas	$\dot{m}_5, X_{CF}^V, X_S^V, \dot{m}_{10}, X_{CF}^V, X_S^V, X_{DCM}^X, \dot{m}_{11}, \dot{m}_{12}$	9	$\dot{m}_6, \dot{m}_7, \dot{m}_9$	3	$\dot{m}_1, \dot{m}_2, \dot{m}_8, \dot{m}_9, \dot{m}_{11}, \dot{m}_{12}, \dot{m}_{10}, X_{CF}^V, X_S^V, X_{DCM}^X$		10	
Balances de materia	CF, S, W, CDM	4	DCM	1	CF, S, W, CDM		4	
Relaciones entre variables	Eficiencia de eliminación de W y DCM	2	Solvente y GC (\dot{m}_0 y \dot{m}_9)	1	Solvente y GC (\dot{m}_0 y \dot{m}_9) GC y vapor (\dot{m}_0 y \dot{m}_1)		2	
Grados de libertad	$GL = 9 - 4 - 2$	3	$GL = 3 - 1 - 1$	1	$GL = 10 - 4 - 2$		4	

De tal manera, la estrategia de solución es: resolver el balance alrededor de la unidad de pretratamiento, una vez que se solucionan las ecuaciones de balance resultantes, se regresa a revisar la tabla 3.7. Después, se analiza si algún otro sistema ya tiene cero grados de libertad, y así sucesivamente hasta poder determinar las unidades que nos permitan responder las preguntas planteadas. De modo que la resolución de la unidad de pretratamiento permitirá conocer las incógnitas \dot{m}_3 y X_S^{III} , por lo que se observa que el sistema compuesto por el extractor-evaporador, ya tendría $GL=0$. Los demás subsistemas aún no pueden solucionarse. La resolución de los balances alrededor del extractor-evaporador

permitiría conocer: las unidades de secado, punto de mezclado y evaporador. Por lo que estos podrían solucionarse de manera indistinta para encontrar respuesta a las preguntas planteadas. Teniendo en cuenta estas conclusiones, se procede a proyectar y resolver las ecuaciones en ese orden.

Paso 4 y 5. Planteamiento, simplificación y resolución de la(s) ecuación(es) de balance(s)

A partir de la Ecuación General de Balance (EGB)

$$A = E - S + G - C \quad (3.43)$$

Donde:

A es la acumulación en el sistema;

E y S son las entradas y salidas de materia de este por las fronteras del mismo respectivamente; y

G y C son los términos de generación y consumo dentro del sistema.

Considerando que el sistema opera en estado estacionario y que no se llevan a cabo reacciones, entonces tenemos que: $A = 0$ y $G = C = 0$ por lo que EG, ecuación (3.43), se simplifica a su forma más simple:

$$E = S \quad (3.44)$$

En este caso, todas las unidades operan en estado estacionario y no se llevan a cabo reacciones en ellas; por lo que los balances —por componentes y global en cada una de ellas— tienen la forma de la ecuación (3.44).

Balance alrededor de la unidad de pretratamiento:

De acuerdo al AGL, se sabe que se tienen que plantear tres ecuaciones de balance; una para componente (CF, S y W), además de una expresión que relacione las variables \dot{m}_0 y \dot{m}_1 . Aplicando la ecuación (3.44) para cada uno de los integrantes del sistema se obtiene:

Balance para la cafeína (CF):

$$500 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left| 0.023 \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} \right| = \dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left| (0.55 - X_s^{\text{III}}) \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} \right| \quad (3.45)$$

Balance para los sólidos (S):

$$500 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.867 \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} = \dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \right| X_s^{III} \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} \quad (3.46)$$

Balance para el agua (W):

$$500 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.110 \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} + \dot{m}_1 = \dot{m}_2 \frac{\text{kgW}}{h} + \dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \right| 0.450 \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} \quad (3.47)$$

Relación:

$$\dot{m}_1 = 500 \frac{\text{kg}}{h} \left| 1.25 \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} \right. \quad (3.48)$$

Balance Global (ecuación dependiente):

$$\dot{m}_0 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_1 \frac{\text{kg}}{h} = \dot{m}_2 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \quad (3.49)$$

Estrategia de resolución de ecuaciones: Se tiene un sistema de cinco ecuaciones algebraicas (ecuaciones 3.45 a 3.49), se utilizarán cuatro de ellas para encontrar el mismo número de incógnitas y la última se usará para comprobar los resultados. De (3.48) se encuentra el valor de \dot{m}_1 ; este se sustituye en las ecuaciones (3.47) y (3.49) y se resuelven simultáneamente para encontrar los valores de \dot{m}_2 y \dot{m}_3 . El de X_s^{III} se encuentra de la ecuación (3.46).

Finalmente, el valor de X_{CF}^{III} se encuentra por diferencia. Se verifican los resultados en la ecuación que no se utilizó para encontrar dichos valores, en este caso la ecuación (3.45). Debido a que las concentraciones requeridas de composición de los granos de café descafeinados son del orden de magnitud de mg/kg (1×10^{-6} kg/kg), las cifras significativas después del punto decimal serán de seis en las fracciones másicas.

Resolución del sistema de ecuaciones:

$$\text{de (3.48)} \quad \dot{m}_1 = 625 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.47) y (3.49)} \quad \dot{m}_2 = 315.909 \frac{\text{kg}}{h} \quad \text{y} \quad \dot{m}_3 = 809.091 \frac{\text{kg}}{h}$$

de (3.46) $X_S^{III} = 0.535787$ por lo tanto $X_{CF}^{III} = 0.014213$

Verificando en (3.45): $(500)0.023 \frac{\text{kgCF}}{h} \approx 809.091(0.014213) \frac{\text{kgCF}}{h}$

Balance alrededor de la unidad de extractor-evaporador:

Los balances de los cuatro componentes en esta unidad se obtienen al aplicar a cada uno la ecuación (3.44).

Balance para la cafeína (CF):

$$\dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_{CF}^{III} \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_{CF}^V \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} + \dot{m}_8 \frac{\text{kg}}{h} \right. \right. \quad (3.50)$$

Balance para los sólidos (S):

$$\dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_S^{III} \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_S^V \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} \right. \right. \quad (3.51)$$

Balance para el agua (W):

$$\dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.45 \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| (0.993775 - X_{CF}^V - X_S^V) \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} \right. \right. \quad (3.52)$$

Balance para el solvente (DCM):

$$\dot{m}_9 = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| 6.226 \times 10^{-3} \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} \right. \quad (3.53)$$

Relación:

$$\dot{m}_9 = 500 \frac{\text{kg}}{h} \left| \frac{10}{1\,000} \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} \right. \quad (3.54)$$

Balance Global (ecuación dependiente):

$$\dot{m}_3 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_9 \frac{\text{kg}}{h} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_8 \frac{\text{kg}}{h} \quad (3.55)$$

Estrategia de resolución de ecuaciones:

Del sistema de seis ecuaciones algebraicas (ecuaciones 3.50 a 3.55), las variables \dot{m}_3 , X_{CF}^{III} y X_S^{III} son conocidas, de tal forma que se utilizarán cinco de ellas para encontrar el mismo número de variables desconocidas, y la última se utiliza para comprobar los resultados. De (3.54) se encuentra el valor de \dot{m}_9 ; de (3.53) el de \dot{m}_5 ; de (3.51) el de X_{CF}^{IV} ; de (3.55) el de \dot{m}_8 . El valor de X_{CF}^V se halla de la ecuación (3.50). Finalmente, la solución de X_S^V se encuentra por diferencia. Se verifican los resultados en la ecuación no utilizada, ecuación (3.52).

Resolución del sistema de ecuaciones:

$$\text{de (3.54)} \quad \dot{m}_9 = 5 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.53)} \quad \dot{m}_5 = 803.084 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.51)} \quad X_S^V = 0.539794 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.55)} \quad \dot{m}_8 = 11.007 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.50)} \quad X_{CF}^V = 6.138 \times 10^{-4} \quad \text{por lo tanto} \quad X_W^V = 0.453366$$

$$\text{Verificando en (3.52):} \quad 809.091(.45) \frac{\text{kgW}}{h} \approx 803.084(0.453366) \frac{\text{kgW}}{h}$$

Balance alrededor del evaporador:

A partir de la EGB simplificada ecuación (3.44) se obtienen los balances por componentes.

Balance para la cafeína (CF):

$$\dot{m}_4 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.018 \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} = \dot{m}_8 \frac{\text{kgCF}}{h} \right. \quad (3.56)$$

Balance para el solvente (DCM):

$$\dot{m}_4 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.982 \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} = \dot{m}_6 \frac{\text{kgDCM}}{h} \right. \quad (3.57)$$

Balance Global (ecuación dependiente):

$$\dot{m}_4 \frac{\text{kg}}{h} = \dot{m}_6 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_8 \frac{\text{kg}}{h} \quad (3.58)$$

Estrategia de resolución de ecuaciones: ya que \dot{m}_8 es conocida, de (3.56) se encuentra el valor de \dot{m}_4 ; de (3.58) el de \dot{m}_6 y se verifican los resultados en la ecuación no utilizada, ecuación (3.57).

Resolución del sistema de ecuaciones:

$$\text{de (3.56)} \quad \dot{m}_4 = 611.504 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{de (3.58)} \quad \dot{m}_6 = 600.497 \frac{\text{kg}}{h}$$

$$\text{Verificando en (3.57):} \quad 611.504 \frac{\text{kg}}{h} \left| 0.982 \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} \approx 600.497 \frac{\text{kg}}{h} \right.$$

Balance alrededor del punto de mezclado:

En este sistema solo se plantea el balance al único componente del sistema.

Balance global:

$$\dot{m}_6 \frac{\text{kg}}{h} + \dot{m}_9 \frac{\text{kg}}{h} = \dot{m}_7 \frac{\text{kg}}{h} \quad (3.59)$$

De (3.59), $\dot{m}_7 = 605.497 \frac{\text{kg}}{h}$

Balance alrededor del secador:

La EGB simplificada ecuación (3.44), se aplica a los cuatro componentes del sistema.

Balance para la cafeína (CF):

$$\dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_{CF}^V \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} \right| = \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{h} \left| X_{CF}^X \frac{\text{kgCF}}{\text{kg}} \right| \quad (3.60)$$

Balance para los sólidos (S):

$$\dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_S^V \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} \right| = \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{h} \left| X_S^X \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} \right| \quad (3.61)$$

Balance para el solvente (DCM):

$$\dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| 6.226 \times 10^{-3} \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} \right| = \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{h} \left| X_{DCM}^X \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} \right| + \dot{m}_{11} \frac{\text{kg}}{h} \quad (3.62)$$

Balance para el agua (W):

$$\dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{h} \left| X_W^V \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} \right| = \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{h} \left| \left(1 - X_{CF}^X - X_S^X - X_{DCM}^X \right) \frac{\text{kgS}}{\text{kg}} \right| + \dot{m}_{12} \frac{\text{kgW}}{h} \quad (3.63)$$

Relaciones

$$\dot{m}_{11} \frac{\text{kg}}{\text{h}} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left| 6.226 \times 10^{-3} \frac{\text{kgDCM}}{\text{kg}} (0.99999) \right. \quad (3.64)$$

$$\dot{m}_{12} \frac{\text{kgW}}{\text{h}} = \dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left| X_w^V \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} (0.85) \right. \quad (3.65)$$

Balance Global (ecuación dependiente):

$$\dot{m}_5 \frac{\text{kg}}{\text{h}} = \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_{11} \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_{12} \frac{\text{kg}}{\text{h}} \quad (3.66)$$

Estrategia de resolución de ecuaciones: La corriente \dot{m}_5 y su composición ya son conocidas, de tal manera que de (3.64) se encuentra el valor de \dot{m}_{11} ; de (3.65) el de \dot{m}_{12} ; de (3.66) el de \dot{m}_{10} ; y se verifican los resultados en la ecuación no utilizada (3.57).

Resolución del sistema de ecuaciones:

$$\text{de (3.64)} \quad \dot{m}_{11} = 4.99995 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

$$\text{de (3.65)} \quad \dot{m}_{12} = 309.477 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

$$\text{de (3.66)} \quad \dot{m}_{10} = 488.607 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

$$\text{de (3.60)} \quad X_{CF}^X = 1.009 \times 10^{-3}$$

$$\text{de (3.61)} \quad X_s^X = 0.887217$$

$$\text{de (3.62)} \quad X_{DCM}^X = 1.023 \times 10^{-7} \quad \text{y} \quad X_w^X = 0.11177$$

Verificando en (3.63):

$$803.084 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left| 0.453366 \frac{\text{kgW}}{\text{kg}} \approx 488.607 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \right| 0.111774 + 309.477 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$$

Balance alrededor del proceso (global)

El balance global del proceso completo no fue necesario resolverlo, debido a que ya se conocen todas las incógnitas, sin embargo, se puede plantear uno para comprobar los resultados:

$$\dot{m}_0 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_1 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_9 \frac{\text{kg}}{\text{h}} = \dot{m}_2 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_8 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_{10} \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_{11} \frac{\text{kg}}{\text{h}} + \dot{m}_{12} \frac{\text{kg}}{\text{h}} \quad (3.67)$$

$$500 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 625 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 5 \frac{\text{kg}}{\text{h}} = 315.901 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 11.007 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 488.607 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 4.99995 \frac{\text{kg}}{\text{h}} + 309.477 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \quad (3.68)$$

Paso 6. Resultados

- i. La cantidad de café verde descafeinado que se produce por hora (\dot{m}_{10}) es de $488.607 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$
- ii. La cantidad de cafeína seca que se produce por hora (\dot{m}_8) es de $11.007 \frac{\text{kg}}{\text{h}}$
- iii. La relación entre flujo de DCM recirculado (\dot{m}_6) y flujo de alimentación fresca (\dot{m}_9) en el proceso de extracción es de 120 a 1.
- iv. De acuerdo a las condiciones especificadas, indicar si el café verde descafeinado producido cumple con las normas establecidas en la NOM NMX-F-552-1998, respecto al contenido máximo de DCM, humedad y cafeína de 0.12%, 12.5% y 10 ppm, respectivamente.
La composición de la corriente \dot{m}_{10} de los granos de café verde descafeinados es de 0.10% de cafeína, 11.18% de agua y 1.023×10^{-5} o 10.23 ppm. Por lo que el café producido cumple con las especificaciones de contenido máximo de cafeína y humedad; pero, excede ligeramente el máximo permitido de DCM.
- v. La eficiencia de extracción de la cafeína se calcula como:

$$\eta_{\text{extracción}} = \frac{\dot{m}_8}{\dot{m}_0(0.023)} \times 100\% = 95.71\% \quad (3.69)$$

Factores de escalamiento

La resolución de los balances de materia constituye una herramienta útil que permite caracterizar y dimensionar los procesos; de igual manera, si las condiciones, rendimientos, etc., no cambian, los datos calculados podrían ser utilizados para estimar factores de escalamiento. Es decir, si se deseara procesar más o menos gramos de café verde, o si se quisiera incrementar la producción de estos.

Por ejemplo, considere que se desean producir 1 200 kg/h de granos verdes de café descafeinado y que las instalaciones descritas tienen la capacidad de hacerlo, ¿cuál sería el flujo de recirculación requerido?

El flujo de recirculación se calcula a partir del factor $\frac{600.407 \text{ kg de DCM recirculados / h}}{488.607 \text{ kg de café descaf. producido / h}}$

Por lo tanto, para producir 1 200 kg/h de café descafeinado se requiere un flujo de recirculación de DCM de 1 474.8 kg/h.

Problema 3.4 Balance de energía en un proceso de producción de café descafeinado

Adela Irmene Ortíz López

Introducción

Considerando la metodología y el proceso descritos en el capítulo anterior, en este capítulo se calculan los requerimientos energéticos de dicho proceso con el fin de determinar cuánto combustible se requiere para producir el vapor que necesita el pretratamiento y el calor que deben ceder los gases de combustión para llevar a cabo el proceso de secado. Dicha información se puede obtener a partir de los balances de materia y energía en la caldera y en el proceso de secado.

Enunciado del problema

Se consideró el mismo proceso de producción de café en grano descafeinado descrito en el capítulo anterior, y que dicho proceso opera bajo las mismas condiciones. Se sabe que la caldera produce el vapor saturado a 5 atm a partir de agua a 25 °C para el pretratamiento de los granos verde de café. El horno de la caldera se alimenta con una corriente de 30% de aire en exceso y gas natural cuya composición es 94% metano, 2% dióxido de carbono y balance de nitrógeno; ambas corrientes deben estar a 25 °C y 1 atm para llevar a cabo la combustión. La conversión del metano es del 90%. Los gases calientes de combustión salen del horno a 750 °C y se utilizan para el proceso de secado de los granos descafeinados. Este proceso se lleva a cabo mediante una cámara de secado vibratoria en donde el calor requerido lo proveen los gases de combustión emitidos por la caldera, sin entrar en contacto directo de los granos. Considerar que los granos entran y salen a 30 °C mientras que el agua y el DCM eliminados salen a 130 °C.

Estimar:

- i. La cantidad de gas natural y aire requerido para producir el vapor saturado.
- ii. La composición del gas de combustión a la salida de la caldera.
- iii. La temperatura final de los gases de combustión después del secado.

Paso 1. Descripción y clasificación del proceso

Se trata de un proceso de varias unidades sin reacción (humectación, extracción, evaporación y secado) y una unidad con reacción (caldera), que es en donde se lleva a cabo la reacción de combustión. Todo el proceso es continuo y se asume estado estacionario, es decir, los flujos del sistema son constantes con respecto al tiempo.

Paso 2. Diagrama del proceso

Los balances de materia se resolvieron en el capítulo anterior, por lo que todos los flujos y composiciones en todas las unidades son conocidos; excepto en la caldera. Por otro lado, las unidades donde son relevantes los balances de energía son la caldera y el secador, por lo que el diagrama solo incluye a esas dos unidades. La información encontrada en los balances de materia del capítulo anterior ya se encuentra en el diagrama (figura 3.7).

Paso 3. Análisis de grados de libertad (AGL)

El análisis de grados de libertad se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo anterior y se muestra en la tabla 3.8. A partir de este análisis se concluye que se cuenta con suficiente información para resolver ambas unidades y calcular la cantidad de gas natural (\dot{n}_1) y aire requerido para producir el vapor saturado (\dot{n}_2); la composición del gas de combustión a la salida de la caldera ($\dot{n}_3, \dot{n}_4, \dot{n}_5, \dot{n}_6, \dot{n}_7$) y la temperatura final T_s de los gases de combustión después del secado que son las preguntas planteadas.

Tabla 3.8. Análisis de grados de libertad del sistema y los subsistemas.

Unidad/ Parámetros	Caldera		Secador	
	Descripción	#	Descripción	#
Incógnitas	$\dot{n}_1, \dot{n}_2, \dot{n}_3, \dot{n}_4, \dot{n}_5, \dot{n}_6, \dot{n}_7$	7	T_s	1
Reacción	1 reacción de combustión	1		0
Balances de materia Especies reactivas	$\text{CH}_4, \text{CO}_2, \text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	4		0
Balances de materia Especies inertes	N_2	1		
Balances de energía	Para la caldera	1	Para el secador	1
Relaciones entre variables	Conversión del CH_4 Exceso de aire	2	-	0
Grados de libertad	$GL = 7 + 1 - 4 - 1 - 1 - 2$	0	$GL = 1 - 1$	0

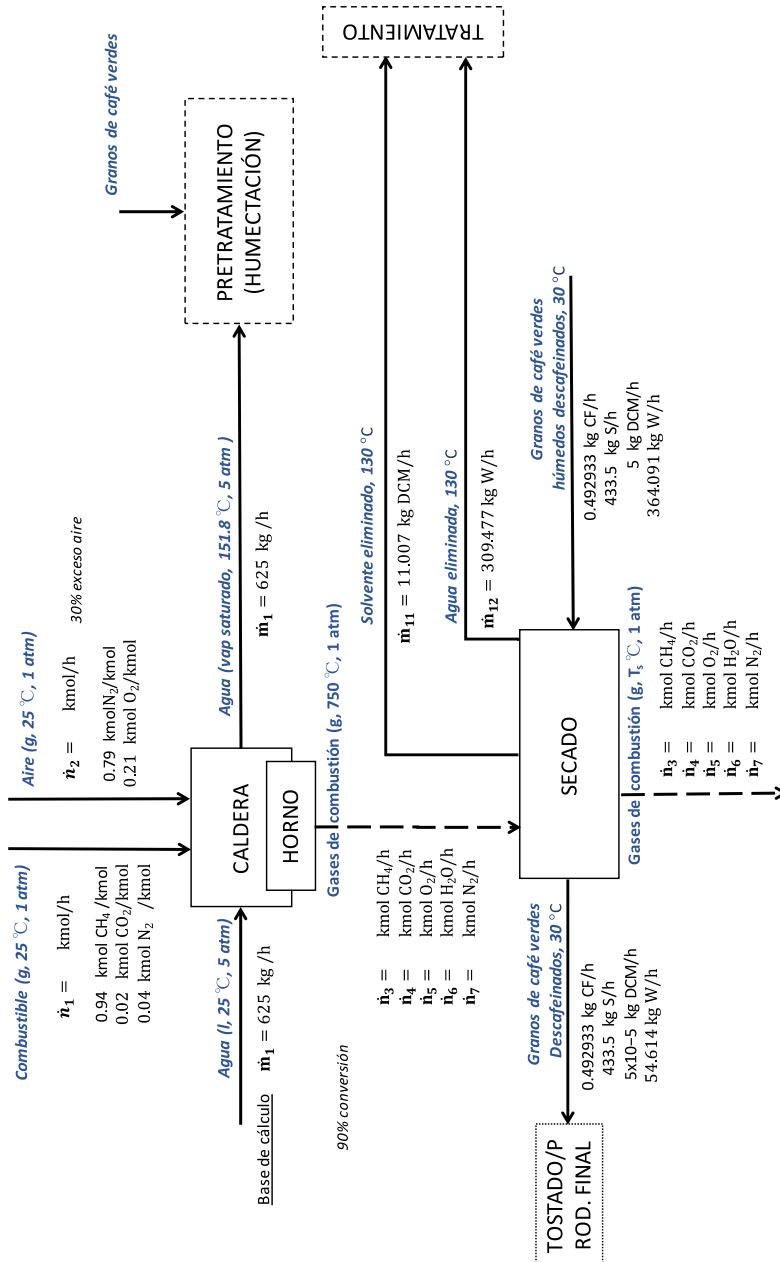


Figura 3.7. Diagrama del proceso. CF – caféína; GC - Granos de café; S - sólidos no solubles/extraíbles; W-agua; DCM- diclorometano (CH₂Cl₂). Los flujos individuales fueron calculados a partir del flujo total y las fracciones de cada componente. La temperatura de saturación del vapor (151.8 °C) se obtuvo de la Tabla B.7 de (Felder & Rousseau, 2006).

Paso 4 y 5. Planteamiento, simplificación y resolución de la(s) ecuación(es) de balance(s)

Balances alrededor de la caldera

La reacción de combustión que se lleva a cabo en el horno de la caldera es:



A partir de la Ecuación General de Balance (EGB):

$$A = E - S + G - C \quad (3.71)$$

Donde A es la acumulación en el sistema; E y S son las entradas y salidas de materia al sistema por las fronteras del sistema, respectivamente y; G y C son los términos de generación y consumo dentro del sistema asociados a los reactivos y productos de las reacciones. Y considerando que el sistema opera en estado estacionario ($A = 0$) entonces tenemos:

$$S = E + G - C \quad (3.72)$$

La ecuación (3.72) puede ser expresada en forma indicial y considerando el grado de avance de reacción obteniendo:

$$\dot{n}_i = \dot{n}_{i0} + \sum_j v_{ij} \xi_j \quad (3.73)$$

Donde v_{ij} es el coeficiente estequiométrico del compuesto i en la reacción j ; estos toman valores positivos para los productos y negativos para los reactivos que se producen y consumen, respectivamente. Mientras que ξ_j es el grado de avance de la reacción j . Así, \dot{n}_i y \dot{n}_{i0} son los flujos de salida y entrada, respectivamente. Mientras que $v_{ij}\xi_j$ dependiendo de su signo son los términos de generación y consumo.

En este caso tenemos que i son CH_4 , CO_2 , O_2 y H_2O y solo tenemos una reacción ($j=1$), así que aplicando la ecuación (3.73) a cada uno de los componentes involucrados de la reacción tenemos:

Balance para el CH_4 :

$$\dot{n}_3 = \dot{n}_1 (0.94) - \xi_1 \quad (3.74)$$

Balance para CO₂:

$$\dot{n}_4 = \dot{n}_1 (0.02) + \xi_1 \quad (3.75)$$

Balance para O₂:

$$\dot{n}_5 = \dot{n}_2 (0.21) - 2\xi_1 \quad (3.76)$$

Balance para H₂O:

$$\dot{n}_6 = 2\xi_1 \quad (3.77)$$

Balance para N₂, especie no reactiva por lo tanto la ecuación (3.71) se simplifica a E = S

$$\dot{n}_1(0.04) + \dot{n}_2(0.79) = \dot{n}_7 \quad (3.78)$$

Relaciones:

La fracción de exceso está definida como:

$$f_i \text{ exceso} = \frac{n_i \text{ alimentados} - n_i \text{ estequiométricos}}{n_i \text{ alimentados}} \quad (3.79)$$

Donde la fracción de exceso del componente *i* se calcula como la diferencia entre los moles alimentados y los moles estequiométricos (dado por la reacción) dividido entre los moles alimentados.

Por otro lado, la fracción de conversión del metano (*f*) está definida como los moles que reaccionaron entre los moles alimentados,

$$f_i \text{ conversión} = \frac{n_i \text{ Entrada} - n_i \text{ Salida}}{n_i \text{ alimentados}} \quad (3.80)$$

De acuerdo a estas definiciones tenemos que:

$$f_{\text{exceso } O_2} = \frac{n_2(0.21) - n_{O_2} \text{ estequiométrico}}{n_2(0.21)} = 0.3 \quad (3.81)$$

$$f_{\text{exceso } O_2} = \frac{n_2(0.21) - n_{O_2} \text{ estequiométrico}}{n_2(0.21)} = 0.3 \quad (3.82)$$

En el sistema de ecuaciones resultantes de los balances de materia (ecuaciones 3.74-3.78, 3.81 y 3.82) se tienen 8 incógnitas en 7 ecuaciones por lo que se debe completar el sistema con la ecuación de balance de energía, tal como se indicó en el análisis de grados de libertad.

Balance de energía para la caldera

Partiendo de la primera ley de la termodinámica tenemos para un sistema continuo en estado estacionario:

$$\Delta\dot{H} + \Delta\dot{E}_k + \Delta\dot{E}_p = \dot{Q} - \dot{W}_s \quad (3.83)$$

La ecuación (3.83) se puede simplificar despreciando los términos de energía potencial, energía cinética y trabajo. Ya que el sistema no se está acelerando $\Delta\dot{E}_k = 0$, el sistema no tiene grandes distancias verticales entre la entrada y la salida, por tanto, $\Delta\dot{E}_p = 0$ y finalmente, el sistema no intercambia energía a través de las fronteras mediante alguna parte móvil, corriente eléctrica o radiación entonces $\dot{W}_s = 0$. Porque la ecuación (3.83) se simplifica a

$$\Delta\dot{H} = \dot{Q} \quad (3.84)$$

En donde el cambio en la entalpia se calcula como:

$$\Delta\dot{H} = \sum_{salida} m_j \hat{H}_j - \sum_{entrada} m_j \hat{H}_j \quad (3.85)$$

La ecuación (3.84) puede aplicarse al vapor de agua y al horno y plantear el balance de la caldera como una igualdad, considerando que el calor que gana el agua para convertirse en vapor, es igual al calor que se obtiene de la reacción en el horno; es decir, que no existen pérdidas de energía (calor), o que éstas son despreciables. De tal manera que el calor generado en el horno en magnitud es igual al calor ganado por el agua, pero con signo contrario.

Balance en la caldera:

$$\dot{Q}_{vapor} = -\dot{Q}_{horno} \quad (3.86)$$

Dado que tenemos la información para calcular la energía requerida para generar la masa de vapor, vamos a plantear este balance y después se igualará al balance de energía del horno.

$$\dot{Q}_{\text{vapor}} = 625 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \left(2747.5 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} - 104.8 \frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \right) = 1,651,687.5 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} \quad (3.87)$$

Los valores de las entalpías específicas de vapor saturado a 5 atm y del agua líquida a 25 °C y 1 atm fueron tomados de las tablas B.5 y B.7 de (Felder & Rousseau, 2006), respectivamente.

El balance de energía para el horno se escribe como:

$$\dot{Q}_{\text{horno}} = \xi_1 \Delta \hat{H}_r^0 + \sum_{\text{salida}} \dot{n}_j \hat{H}_j - \sum_{\text{entrada}} \dot{n}_j \hat{H}_j = -1,651,687.5 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} \quad (3.88)$$

En donde $\Delta \hat{H}_r^0$ es el calor estándar de reacción que se calcula a partir de los calores estándar de formación de cada compuesto:

$$\Delta \hat{H}_r^0 = \sum_{\text{productos}} |v_i| \Delta \hat{H}_{fi}^0 - \sum_{\text{reactivos}} |v_i| \Delta \hat{H}_{fi}^0 \quad (3.89)$$

Estrategia de resolución de ecuaciones: Se tiene un sistema de ocho ecuaciones algebraicas (ecuaciones 3.74–3.78, 3.81, 3.82 y 3.88) para encontrar la composición de los gases de combustión y el grado de avance de reacción que se deben de resolver de manera simultánea. El cual podría hacerse con la ayuda de una *solver* de ecuaciones. Para ello, se deben estimar primero las entalpías de los flujos de entrada y salida del horno mediante tablas y cálculos. Y el calor de reacción estándar ($\Delta \hat{H}_r^0$).

Del análisis del sistema de ecuaciones obtenido podemos observar que todos los flujos del horno son desconocidos, por lo que una estrategia de solución podría ser plantear una base cálculo en el horno, lo cual permitiría estimar el calor generado en el horno y, ya que se conoce el calor real que se debería generar para producir los 625 kg/h de vapor requeridos en el pretratamiento de los granos de café (figura 3.7), se recalculan los flujos.

Resolución: Considerando una base de cálculo de 100 mol/h del combustible (\dot{n}_1)

De (3.82) $\dot{n}_3 = 9.4 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

Sabiendo que $\dot{n}_1 = 100 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$ se puede calcular el O₂ estequiométrico:

$$n_{\text{O}_2 \text{ estequiométrico}} = 100 \frac{\text{mol}}{\text{h}} \left| \frac{0.94 \text{ mol CH}_4}{\text{mol}} \right| \left| \frac{2 \text{ mol O}_2}{\text{mol CH}_4} \right| = 188 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$$

De (3.81) se obtiene que el flujo de O_2 alimentado es $n_{O_2} = 244.4 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

Por lo que $\dot{n}_2 = 244.4 \frac{\text{mol } O_2}{\text{h}} \left| \frac{\text{mol aire}}{0.21 \text{ mol } O_2} \right. = 1163.8 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

Y de manera análoga se obtiene el flujo de nitrógeno:

$\dot{n}_{N_2} = 244.4 \frac{\text{mol } O_2}{\text{h}} \left| \frac{0.79 \text{ mol } N_2}{0.21 \text{ mol } O_2} \right. = 919.4 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

de (3.74) se obtiene que $\xi_1 = 84.6 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

de (3.75) se encuentra que $\dot{n}_4 = 86.6 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

de (3.76) se calcula $\dot{n}_5 = 75.2 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

de (3.77) se obtiene $\dot{n}_6 = 169.2 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

de (3.78) se obtiene que $\dot{n}_7 = 923.4 \frac{\text{mol}}{\text{h}}$

Al sumar los flujos (\dot{n}_3 , \dot{n}_4 , \dot{n}_5 , \dot{n}_6 , \dot{n}_7), se obtiene el flujo total del gas de combustión $\dot{n}_{\text{Total}} = 1263.81 \text{ mol/h}$, y al dividir cada uno entre el total, se obtiene la composición en fracción molar. Por lo que:

$$y_{CH_4} = 0.0074; y_{CO_2} = 0.0685; y_{N_2} = 0.7307; y_{O_2} = 0.0595; y_{H_2O} = 0.1339$$

En la tabla 3.9 se muestran los resultados del balance de materia; así como las entalpías de formación de los componentes utilizados para calcular la entalpía estándar de reacción y los valores de las entalpías de los flujos estimados necesarios para resolver el balance de energía en el horno. Los estados de referencia considerando las condiciones de entrada del combustible y el aire (25°C y 1 atm), de tal manera que las entalpías de dichas corrientes son cero y las entalpías a estimar son $\hat{H}_1, \hat{H}_2, \hat{H}_3, \hat{H}_4, \hat{H}_5$, es decir, los cambios de entalpía desde el estado de referencia, hasta el estado de salida.

Tabla 3.9. Balances de materia y cálculos de entalpías en la caldera.

Compuesto	$\Delta \hat{H}_f^0 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	ENTRADA		SALIDA	
		$\dot{n}_i \left(\frac{\text{mol}}{\text{h}} \right)$	$\hat{H}_i \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	$\dot{n}_i \left(\frac{\text{mol}}{\text{h}} \right)$	$\hat{H}_i \left(\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$
CH ₄	-74.85	94	0	9.4	$\hat{H}_1 = 39.884$
CO ₂	-393.5	2	0	86.6	$\hat{H}_2 = 9.315$
O ₂	0	244.4	0	75.2	$\hat{H}_3 = 6.890$
H ₂ O	-285.84	-	-	169.2	$\hat{H}_4 = 70.751$
N ₂	0	923.4	0	923.4	$\hat{H}_5 = 6.625$

Tabla B.1 (Felder & Rousseau, 2006). Estados de referencia: CH₄ (g), CO₂(g), O₂(g), H₂O(l) @25°C y 1 atm.

El cálculo de \hat{H}_1 corresponde al cambio de entalpia del CH₄ de (g, 25°C y 1 atm) → (g, 250°C y 1 atm), es decir, un cambio de entalpia debido a un cambio de temperatura, por lo tanto, se evalúa como la integral de la capacidad calorífica del CH₄.

$$\hat{H}_1 = \int_{25^\circ\text{C}}^{750^\circ\text{C}} C_p(T) dt \tag{3.90}$$

La expresión del C_p del metano fue tomada de la Tabla B.2 de (Felder & Rousseau, 2006).

$$C_{p_{CH_4(g)}} = 34.33 \times 10^{-3} + 5.469 \times 10^{-5} T + 0.3661 \times 10^{-8} T^2 - 11 \times 10^{-12} T^3 \tag{3.91}$$

Después de integrar y evaluar la expresión anterior se obtuvo el valor mostrado en la Tabla 2.

Los valores de \hat{H}_2 , \hat{H}_3 , \hat{H}_4 fueron encontrados por interpolación de la Tabla B.8 de Felder R. (Felder & Rousseau, 2006).

El cálculo de \hat{H}_5 corresponde al cambio de entalpía de H₂O desde (l, 25°C y 1 atm) → (g, 750°C y 1 atm), es decir, se deben a cambios de temperatura y de fase, por lo tanto se evalúa como:

$$\hat{H}_5 = \int_{25^\circ\text{C}}^{100^\circ\text{C}} C_p(T) dt + \Delta \hat{H}_v + \int_{100^\circ\text{C}}^{750^\circ\text{C}} C_p(T) dt \tag{3.92}$$

Los datos usados para calcular el valor mostrado en la tabla 3.9 a partir de los siguientes datos:

$$T_b = 100^\circ\text{C}; \Delta \hat{H}_v = 40.656 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}; C_{p_{H_2O(l)}} = 75.4 \times 10^{-3}$$

$$C_{p_{H_2O(g)}} = 33.46 \times 10^{-3} + 0.688 \times 10^{-5} T + 0.7604 \times 10^{-8} T^2 - 3.593 \times 10^{-12} T^3 \quad (3.93)$$

La entalpía de evaporación del agua evaluada, la temperatura de ebullición y 1 atm fueron datos obtenidos de la Tabla B.1. (National Institute of Standards & Technology); mientras que las expresiones de capacidad calorífica para el H₂O en fase gas y líquida fueron tomadas de la Tabla B.2. (Felder & Rousseau, 2006).

Por otro lado, la entalpía de reacción estándar se calculó de acuerdo a la ecuación (3.89):

$$\Delta \hat{H}_r^0 = [(-393.5) + (2)(-285.84)] - [-74.85] = -890.3 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Sustituyendo todos los valores en la Ec. (3.86):

$$\dot{Q}_{\text{horno}} = 84.6 \frac{\text{mol}}{\text{h}} \left[(-890.3) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + [0] - [19,788.33] \frac{\text{kJ}}{\text{h}} \right] = -55,533.6 \frac{\text{kJ}}{\text{h}}$$

De la ecuación (3.86) tenemos que el calor requerido para producir los 625 kg/h de vapor saturado es de 1,651,687.5 kJ/h

Es decir, se necesita 29.742 veces, $\left(\frac{1,651,687.5}{55,533.6} \right)$, más calor para producir el vapor requerido.

Por lo que se recalculan con este factor los 100 mol/h de gas natural que se utilizaron como base de cálculo. De igual manera, al multiplicar todos los flujos por el factor de 29.742 se puede verificar en la tabla 3.9 que, efectivamente, se obtiene el calor requerido y por tanto la masa de vapor de 625 kg/h.

Balance en el secador

Para calcular la temperatura de salida de los gases de combustión después de pasar por el secador se requiere plantear el balance de energía en el secador. De igual manera que en la caldera, el calor cedido por los gases es el necesario para evaporar el agua y el solvente por lo que se expresa como:

$$\dot{Q}_{\text{evaporación}} = -\dot{Q}_{\text{gases}} \quad (3.94)$$

En el balance de energía para los granos, solo se consideran los cambios de entalpía del DCM y el agua ya que los componentes sólidos entran y salen a la misma temperatura. El balance tiene la forma de la ecuación (3.84)

$$\begin{aligned} \dot{Q}_{\text{evaporación}} = & 11.007 \frac{\text{kg DCM}}{\text{h}} \left(\int_{30^{\circ}\text{C}}^{39.6^{\circ}\text{C}} C_p(T) dt + \Delta \hat{H}_v + \int_{39.6^{\circ}\text{C}}^{130^{\circ}\text{C}} C_p(T) dt \right) + \\ & + 309.477 \frac{\text{kg W}}{\text{h}} \left(\int_{30^{\circ}\text{C}}^{100^{\circ}\text{C}} C_p(T) dt + \Delta \hat{H}_v + \int_{100^{\circ}\text{C}}^{130^{\circ}\text{C}} C_p(T) dt \right) \end{aligned} \quad (3.95)$$

Para el balance de los gases de combustión, éste tiene de igual manera la forma de la ecuación (3.84) y, para realizar el cálculo, se considera que la mezcla de gases se comporta como el N_2 , por lo que se utilizará su capacidad calorífica. Se considera el flujo total de los gases de combustión ya recalculado con el factor de 29.742:

$$\dot{Q}_{\text{gases}} = 2974.21 \frac{\text{mol}}{\text{h}} \int_{750^{\circ}\text{C}}^{T_s} C_p(T) dt \quad (3.96)$$

De la ecuación (3.95) se encuentra el valor del calor necesario para evaporar el agua y el solvente y se sustituye en la ecuación (3.96), en la cual la incógnita es la temperatura de salida del gas de combustión.

Las expresiones de capacidad calorífica para el agua (mostrados arriba) y para el N_2 fueron tomados de la Tabla B.2 de (Felder & Rousseau, 2006) mientras que los datos de la entalpía de evaporación estándar (evaluados a la temperatura de ebullición y 1 atm) se tomaron de la Tabla B.1 de la misma referencia.

$$C_{p_{\text{N}_2(g)}} = 29 \times 10^{-3} + 0.2199 \times 10^{-5} T + 0.5723 \times 10^{-8} T^2 - 2.781 \times 10^{-12} T^3 \quad (3.97)$$

para el DCM los datos utilizados fueron (National Institute of Standards & Technology):

$$T_b = 39.6 \text{ }^{\circ}\text{C}; \quad \Delta \hat{H}_v = 29 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

$$C_{p_{\text{CH}_2\text{Cl}_2(g)}} = 19.17351 + 136.8444t - 95.12993t^2 + 26.03105t^3 - 0.119405 / t^2$$

con $t = \text{temperatura (K)}/1000$

$$C_{p_{\text{CH}_2\text{Cl}_2(l)}} = 102.3 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$$

Sustituyendo en la ecuación (3.95) se tiene:

$$\begin{aligned} \dot{Q}_{\text{evaporación}} &= 11.007 \frac{\text{kg DCM}}{\text{h}} \frac{\text{mol}}{0.084 \text{ kg W}} (39.884) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + \\ &309.477 \frac{\text{kg W}}{\text{h}} \frac{\text{mol}}{0.018 \text{ kg W}} (70.751) \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} = 811,409.75 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} \end{aligned} \quad (3.98)$$

Por lo tanto, la ecuación (3.96):

$$\begin{aligned} -811,409.75 \frac{\text{kJ}}{\text{h}} &= 2974.21 \frac{\text{mol}}{\text{h}} \int_{250^{\circ}\text{C}}^{T_s \text{ } ^{\circ}\text{C}} \\ &\left(29 \times 10^{-3} + 0.2199 \times 10^{-5} T + 0.5723 \times 10^{-8} T^2 - 2.781 \times 10^{-12} T^3 \right) dt \end{aligned} \quad (3.99)$$

Resolviendo la ecuación anterior se encuentra que $T_s = 47.03 \text{ } ^{\circ}\text{C}$.

Paso 6. Resultados

- i. La cantidad de gas natural y aire requerido para producir el vapor saturado: 2715 mol/h de gas natural y 31, 595.5 mol/hde aire.
- ii. Composición del gas de combustión a la salida de la caldera, al estar expresada en fracción es la misma.
La composición expresada en (%) es: 0.74 de CH₄, 6.85 de CO₂, 73.07 de N₂, 5.95 O₂ y 13.39 de H₂O. El flujo total de gases de combustión es de 2974.21 mol/h
- iii. La temperatura final de los gases de combustión después del secado: $T_s = 47.03 \text{ } ^{\circ}\text{C}$

Problema 3.5 Balance de materia y energía en un reactor de charolas para fermentación en medio sólido

Arturo Alejandro Figueroa Montero

Introducción

La fermentación en medio sólido (FMS) se define como: una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permite el crecimiento de estos organismos; pero no excede el nivel de retención máxima de agua de la matriz sólida, de manera que se forma una fase gaseosa en los espacios entre las partículas sólidas (Minjares-Carranco, Trejo-Aguilar et al, 1997).

La FMS es empleada en la producción de enzimas, principalmente en aquellos procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzimas o alimento. También se emplea en la elaboración de biopesticidas y metabolitos secundarios (Pandey, Selvakumar et al, 1999). El uso de residuos agro-industriales como sustratos en procesos de FMS ofrece una vía alternativa y agrega valor a éstos, que de otra forma es bajo o son considerados residuos no utilizables (Pandey, 2003).

Debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen, que es típica de los procesos en estado sólido, la generación de calor microbiano por unidad de volumen es mucho más grande que la que se produce en los cultivos líquidos. En procesos aerobios, la tasa de producción de calor puede aproximarse utilizando la de evolución de CO_2 o de consumo de O_2 . Un mol de CO_2 producido durante la oxidación de lignina libera aproximadamente 475 KJ de calor. Por lo tanto, es importante medir la evolución de CO_2 durante los procesos de FMS, ya que está directamente relacionada al riesgo del incremento de temperatura (Prior, DuPreez et al, 1992).

Los biorreactores de FMS involucran dos modos de operación: i) estáticos (de charolas y de lecho empacado o columna), y ii) agitados (horizontal, vertical y de tambor rotatorio). La transferencia de calor y masa (CO_2 , O_2 , y agua), en reactores de lecho empacado como en reactores agitados ha sido ampliamente estudiada (Mitchell, von Meien et al, 2003). Sin embargo, aunque los biorreactores de charola han sido empleados desde hace mucho tiempo y son considerados como el biorreactor de FMS más simple, se han publicado po-

cos estudios relacionados con la transferencia de calor y masa en biorreactores de charola (Figuroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011).

El biorreactor de charolas es el más viejo y simple de los biorreactores usados en procesos de FMS (figura 3.8). Las características básicas de la charola son:

- Una capa relativamente delgada (comúnmente 2 a 15 cm) de sustrato es extendida sobre un área horizontal relativamente grande o charola, que pueden estar hechas de: madera, plástico o metal; perforada o no; y colocadas una sobre otra con un espacio entre ellas de unos pocos centímetros.
- No hay aireación forzada; sin embargo, la base de la charola puede estar perforada y el aire logra circular suavemente alrededor de esta.
- El mezclado, cuando se aplica, es intermitente y se realiza por dispositivos simples, automáticos o manuales.
- La temperatura puede cambiar con el ambiente, también la charola puede ser colocada en un gabinete o cuarto con temperatura controlada (Mitchell, Lonsane et al, 1992).

Aunque el lecho de fermentación en un reactor de charolas, es un lecho empacado; la principal diferencia entre éste y uno de charolas es que: en el primero, la aireación es a través de lecho empacado; mientras que, en el segundo, la circulación del aire es sobre y bajo el lecho. Esta desigualdad hace que el análisis de la transferencia de calor y masa para biorreactores de charola, sea más difícil que el realizado para biorreactores de lecho empacado (Figuroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011).

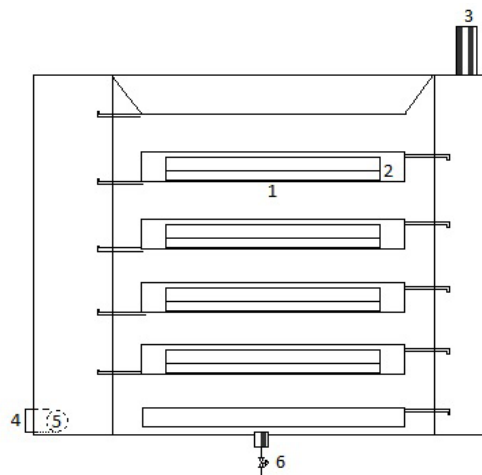


Figura 3.8. Biorreactor de Charolas. 1: soporte de charola; 2: salida de aire; 3: entrada de aire (húmedo o seco); 4: distribuidor de aire; 5: purga de agua condensada; 6: manivela de ventilas (Figuroa Montero, 2011).

Objetivo del problema

Las características térmicas (baja conductividad y densidad de empaque) del material orgánico, así como el bajo contenido de humedad en la FMS crean condiciones especialmente difíciles para la transferencia de calor. En la FMS estática, esta pobre transferencia de calor conduce a un gran incremento en la temperatura del sustrato, lo que tiene un impacto negativo en el crecimiento de los microorganismos, así como en la producción de enzimas (Saucedo-Castaneda, Gutierrez-Rojas et al, 1990).

Lo anterior hace necesario el desarrollo de estrategias que permitan el control tanto de la temperatura como de la humedad; principalmente, cuando se pretende el escalamiento de procesos de FMA desde nivel laboratorio al industrial. Hasta el momento se han elaborado pocas estrategias que permitan la remoción del calor metabólico en biorreactores de charolas. La evaluación de las estrategias que se propongan requiere el desarrollo de balances de materia (agua) y energía (calor), que permitan conocer la contribución de cada uno de los mecanismos de transferencia de calor y masa. Estos balances permitirán elegir las estrategias de remoción de calor más efectivas y que tengan el menor efecto negativo en el lecho de fermentación (secado) (Figueroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011).

Por otro lado, uno de los principales retos en FMS, continúa siendo: la estimación de los coeficientes de transferencia de calor y masa desde el lecho de fermentación hacia el aire en el *headspace* (nombre en inglés con que se designa al espacio de aire dentro del biorreactor que no está dentro de la matriz del sustrato) del biorreactor de charolas para FMS. Estos coeficientes de transferencia son necesarios en los modelos matemáticos (Figueroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011). En algunos trabajos sobre FMS, los coeficientes de transferencia de calor son tomados de aquellos que fueron desarrollados para operaciones con secado de aire, pero estos tienen varias diferencias con los procesos de FMS (Khanahmadi, Roostaazad et al, 2004).

Metodología

La figura 3.9 muestra los balances propuestos y las relaciones generales entre algunos de sus componentes, también expone la importancia central que tiene la medición de CO_2 en los tres análisis, por lo que su determinación es esencial. La medición en línea de CO_2 fue usada para estimar la generación de agua metabólica, la producción de biomasa y calor metabólico. La concentración de biomasa se usó para calcular el contenido de agua en esta. Las principales suposiciones consideradas en los balances son: I) Estimación de las propiedades físicas y termodinámicas del lecho de fermentación. II) Se define una biorreacción para el crecimiento de *Aspergillus niger* bajo condiciones de FMS y se realizó

el balance estequiométrico para la misma. III) Se consideran los gradientes máximos de temperatura y humedad en el sistema de fermentación. IV) La evaporación ocurre desde la superficie de los lechos de fermentación. V) Las propiedades físicas (excepto el calor latente de vaporización) son independientes de la temperatura y permanecen constantes. VI) Entradas y salidas de aire están saturadas de vapor de agua. VII) Los coeficientes estequiométricos (de rendimiento) para la biorreacción propuesta permanecen constantes. VIII) El modelo sólo es válido cuando la temperatura del lecho de fermentación (T_b) es mayor que la temperatura del aire de alimentación (T_a) (Figuroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011).

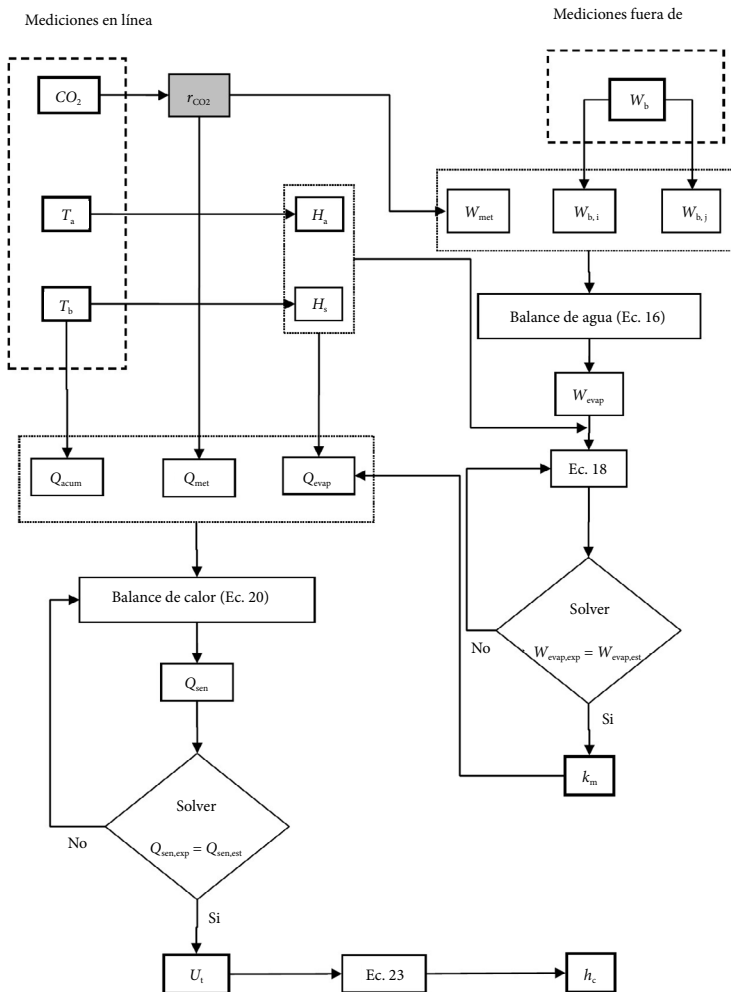


Figura 3.9. Diagrama esquemático de los balances usados en la estimación del coeficiente global de transferencia de calor (U_l) y del coeficiente de transferencia de masa (k_m) (Figuroa-Montero, Esparza-Isunza et al, 2011).

Estimación de las propiedades físicas y termodinámicas del lecho de fermentación

Densidad real o de sólido. La densidad real de los sustratos empleados en FMS es difícil de determinar por métodos analíticos, ya que depende de la composición y la temperatura de los mismos. Las densidades individuales (ρ_i) de cada componente, así como la de composición (de partícula), puede ser determinada con el siguientes conjunto de formulas (Toledo, 2007):

$$\begin{aligned}
 \rho_w &= 997.18 + 0.0031439T - 0.0037574 T^2 \\
 \rho_p &= 997.18 + 0.0031439T \\
 \rho_f &= 997.18 + 0.0031439T \\
 \rho_c &= 997.18 + 0.0031439T \\
 \rho_{fi} &= 997.18 + 0.0031439T \\
 \rho_a &= 997.18 + 0.0031439T
 \end{aligned}
 \tag{3.100}$$

Donde las densidades individuales son:

ρ_w , para el agua (w),
 ρ_p , proteína (p),
 ρ_f , grasa (f),
 ρ_c , carbohidrato (c),
 ρ_{fi} , fibra (fi),
 ρ_a , cenizas (a), y
 T , es la temperatura de la sustancia o mezcla.

La densidad de composición (de partícula), se calcula con la siguiente ecuación (Toledo, 2007).

$$\rho_b = \frac{1}{\sum X_i / \rho_i}
 \tag{3.101}$$

Conductividad térmica del sustrato sólido. Se aplica el siguiente procedimiento (Toledo, 2007), el cual permite estimar la conductividad térmica (k) de una sustancia a partir de las conductividades puras de sus componentes (k_i), así como la fracción volumétrica de cada componente, X_{vi} :

$$k_b = \sum (k_i X_{vi})
 \tag{3.102}$$

Los valores de conductividad en $W \cdot (m \cdot K)^{-1}$ son calculados en $^{\circ}C$ de temperatura (T), que se consideran con las ecuaciones siguientes (Toledo, 2007):

$$\begin{aligned}
 k_w &= 0.57190 + 0.0017625 T - 6.7306 \times 10^{-6} T \\
 k_p &= 2.2196 + 0.0062489 T + 1.10154 \times 10^{-4} T \\
 k_f &= 0.1807 + 0.0027604 T - 1.7749 \times 10^{-7} T \\
 k_c &= 0.2014 + 0.0013874 T - 4.3312 \times 10^{-6} T \\
 k_{fi} &= 0.18331 + 0.0012497 T - 4.3312 \times 10^{-6} T \\
 k_a &= 0.3296 + 0.001401 T - 2.9039 \times 10^{-6} T
 \end{aligned} \tag{3.103}$$

Donde las conductividades respectivamente son:

k_w , agua,
 k_p , proteína,
 k_f , grasa,
 k_c , carbohidratos,
 k_{fi} , fibra, y
 k_a , cenizas

La fracción volumétrica de cada componente es determinada a partir de la fracción másica X_i , así como de las densidades individuales ρ_i y la densidad real ρ_{bs} , descritas anteriormente con la siguiente ecuación (Toledo, 2007):

$$X_{vi} = \frac{X_i \cdot \rho_{bs}}{\rho_i} \tag{3.104}$$

Conductividad térmica del lecho de fermentación. Se calcula conociendo el valor de la fracción volumétrica del sustrato X_{vb} , y del espacio vacío (aire) X_{va} . La primera se evalúa con la siguiente fórmula considerando que la fracción másica del sustrato es igual a uno:

$$X_{vb} = \frac{X_b \cdot \rho_{ap}}{\rho_{bs}} \tag{3.105}$$

Donde: X_b es la fracción másica del sustrato, ρ_{ap} , es la densidad aparente, y ρ_{bs} densidad real, que ya fueron descritas anteriormente. La fracción volumétrica de aire (X_{va}) se calcula por diferencia mediante la siguiente fórmula (Figueroa Montero, 2011):

$$X_{va} = 1 - X_{vb} \tag{3.106}$$

Conociendo los valores de X_{vv} y X_{va} , la conductividad aparente k_{ap} se calcula de la misma manera que la conductividad real con la siguiente fórmula (Figuroa Montero, 2011):

$$k_{ap} = k_a \cdot X_{av} + k_{bs} \cdot X_{bv} \quad (3.107)$$

Capacidad calorífica del lecho de fermentación. La capacidad calorífica o calor específico es: la cantidad de calor que es ganado o perdido por cantidad de masa de una sustancia que acompaña un cambio de temperatura sin una variación de estado. La capacidad calorífica de una sustancia está definida por sus componentes (Singh & Heldman, 2001). Se tienen las siguientes ecuaciones para la estimación de esta variable del medio de fermentación (Singh & Heldman, 2001; Toledo, 2007):

Singh y Heldman:

$$C_p = 1.424 m_c + 1.549 m_p + 1.675 m_f + 0.837 m_a + 4.187 m_w \quad (3.108)$$

Choi y Okos:

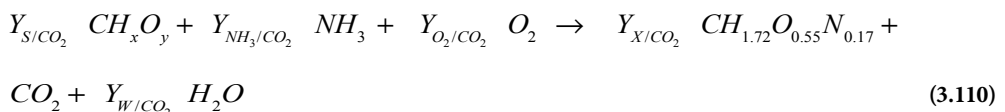
$$C_p = 1.547 m_c + 1.711 m_p + 1.928 m_f + 0.908 m_a + 4.180 m_w \quad (3.109)$$

Donde, las fracciones másicas individuales son:

- m_c , carbohidratos (c),
- m_p , proteínas (p),
- m_f , grasas (f),
- m_a , cenizas (a), y
- m_w , agua (w).

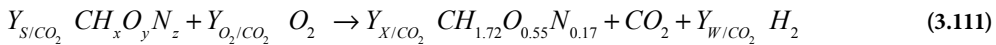
Balance estequiométrico

En el caso de un proceso de FMS con soporte-sustrato, se puede asumir la siguiente ecuación para el desarrollo de *Aspergillus niger*, considerando el crecimiento aerobio sin formación de producto; los coeficientes de rendimiento pueden ser expresados en base C-mol, de tal manera se tiene:



En la ecuación (3.110), se asume que la composición elemental de la biomasa es: $CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$ que corresponde a la composición de biomasa promedio para *Aspergillus niger* (Nielsen, Jens et al, 2003); en la bibliografía pueden encontrarse composiciones elementales para otros microorganismos. La ecuación anterior puede ser útil cuando se conoce la naturaleza del sustrato, como en el caso de un soporte inerte impregnado con un medio definido, los valores de los subíndices x y y pueden ser conocidos (por ejemplo, para la glucosa sería CH_2O y para la sacarosa $CH_{1.833}O_{0.917}$). Aplicando balances elementales a la ecuación (3.110), se obtiene un sistema algebraico subestimado, ya que hay cinco rendimientos desconocidos, pero solo cuatro elementos para realizar estos. A fin de tener un sistema de ecuaciones bien definido, uno de los coeficientes de rendimiento debe ser estimado independientemente (biomasa o sustrato).

Cuando se emplea un sustrato complejo, como el caso de un residuo agro-industrial se puede proponer una biorreacción como la ecuación (3.111). Asumiendo la misma composición para el microorganismo descrito anteriormente, los coeficientes de rendimiento pueden ser expresados en base C-mol:



La ecuación (3.111) es útil cuando se conoce la composición elemental del sustrato (x , y , z), aunque esto presenta dificultades debido a su naturaleza y a la variabilidad que puede tener su composición. Al aplicar balances elementales a esta expresión, se consigue un sistema algebraico bien definido de donde pueden obtenerse los coeficientes de rendimiento.

Una vez que se conocen todos los coeficientes de rendimiento de la biorreacción, así como la cantidad de CO_2 producido, se pueden calcular estequiométricamente los demás componentes faltantes de esta. El CO_2 puede ser medido experimentalmente y su comportamiento simulado a través de modelos matemáticos conocidos, como: el Logístico (ecuación 3.112), o el de Gompertz (ecuación 3.113); dependiendo de las características de la fermentación y del ajuste entre los datos experimentales, así como los obtenidos por tales modelos. En las ecuaciones 3.112 y 3.113 estos son mostrados en su forma integral.

$$r_{CO_2} = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left(1 - \frac{CO_2}{CO_{2\max}} \right) \quad (3.112)$$

$$r_{CO_2} = CO_{2\max} \cdot \beta \cdot \mu_{CO_2} \cdot e^{-\beta e^{-\mu_{CO_2} t}} \cdot e^{-\mu_{CO_2} t} \quad (3.113)$$

La formulación de ecuaciones de reacción en FMS usando residuos agro-industriales es necesaria principalmente por tres razones: (1) La medición de la biomasa formada en procesos de FMS presenta complicaciones, especialmente en soportes que sirven como sustrato, no así en sustentos inertes como PUF o agrolita (Ooijkaas, Weber et al, 2000); (2) no es posi-

ble medir la producción real de agua metabólica en los procesos de FMS y (3) tampoco se pueden describir todas las reacciones exotérmicas llevadas a cabo por el microorganismo.

Balance de materia (agua) en un reactor de charolas para FMS

Los procesos de FMS en biorreactores de charola, son métodos por lote bajo estado no estacionario. La ecuación básica del balance integral de agua en el lecho sólido, para cualquier tiempo entre muestreo, puede ser escrita como sigue:

$$W_{evap,i,j} = W_{b,i} - W_{b,j} + W_{met,i,j} \quad (3.114)$$

Donde: $W_{b,i}$ y $W_{b,j}$ representan el contenido de agua del lecho de fermentación, expresados como gramos de agua, por gramo de soporte inerte seco; corresponden al contenido inicial y final en el lecho sólido, respectivamente; $W_{evap,i,j}$ y $W_{met,i,j}$ corresponden a la masa de agua evaporada y la generada metabólicamente, por gramo de medio de fermentación en cualquier intervalo de tiempo, respectivamente. $W_{met,i,j}$ es calculada mediante la siguiente ecuación:

$$W_{met,i,j} = Mw_W \cdot Y_{W/CO_2} \cdot \int_i^j r_{CO_2} \quad (3.115)$$

Donde:

Mw_W , es el peso molecular del agua,

Y_{W/CO_2} , es el coeficiente de rendimiento para la generación de agua metabólica, y r_{CO_2} , es la tasa de producción de CO_2 , expresada como mol por hora, por gramo de medio de fermentación. La evaporación puede ser escrita como (McCabe, Smith et al, 1993):

$$W_{evap,i,j} = k_m A_c \int_i^j (H_s - H_a) dt \quad (3.116)$$

Donde:

k_m , es el coeficiente convectivo de transferencia de masa para el agua,

A_c , es el área específica de transferencia de masa,

H_a , el contenido de humedad en el flujo de aire a la entrada y

H_s , representa el aire sobre la superficie del lecho de fermentación.

Estos valores pueden ser calculados con las mediciones de temperatura usando una carta psicrométrica, asumiendo que la temperatura en la superficie es igual a la del centro del lecho de fermentación.

Aplicando la ecuación (3.116) y W_{evap} (3.114), para cada intervalo de muestreo, que incluso puede comprender solo el valor inicial y final; permiten la estimación numérica (función "Solver" de Microsoft Excel) del coeficiente convectivo de transferencia de masa (k_m), de la superficie del lecho de fermentación al *headspace* del biorreactor.

Balances de energía (calor) en un reactor de charolas para FMS

La transferencia de calor desde el lecho de fermentación en cada charola, hacia el aire que fluye en los alrededores (*headspace*), sigue al menos tres mecanismos (figura 3.10): i) evaporación de agua desde la superficie del lecho de fermentación, ii) transferencia de calor sensible por conducción y convección desde la superficie del lecho de fermentación, iii) transferencia de calor sensible por conducción y convección desde el fondo de la charola.

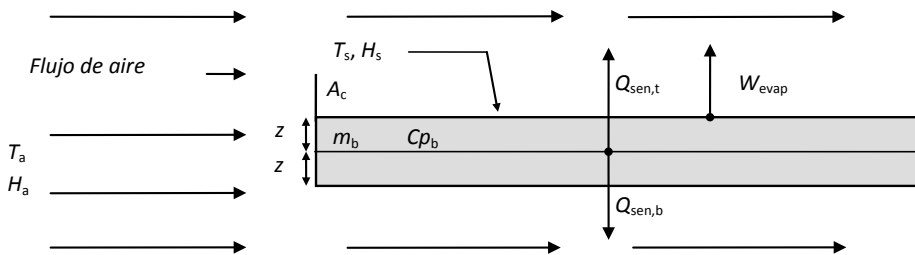


Figura 3.10. Diagrama esquemático de mecanismos de transferencia de calor en la charola de fermentación.

El balance global de energía para cualquier intervalo de tiempo puede ser escrito como:

$$Q_{acum} = -Q_{sen,t} - Q_{sen,b} - Q_{evap} + Q_{met} \quad (3.117)$$

Donde:

Q_{acum} es la acumulación de calor positiva (o negativa), causada por el aumento (o descenso) de la temperatura del lecho de fermentación, T_b .

$Q_{sen,t}$ y $Q_{sen,b}$ son el calor removido a través de la superficie y del fondo del lecho de fermentación, y depende de los coeficientes globales de transferencia de calor (U_t y U_b respectivamente), la diferencia de temperaturas en el sistema ($T_b - T_a$), y el área de transferencia de calor (A_c).

Q_{evap} es el calor removido por evaporación de agua desde la superficie del lecho de fermentación.

Q_{met} es la generación de calor metabólico que puede ser relacionada con la tasa de producción de CO_2 .

Usando estas definiciones en la ecuación (3.117), el balance de energía puede ser expresado como:

$$\frac{Cp_b}{x_{IS}} \frac{dT_b}{dt} = - U_t A_c (T_b - T_a) - U_b A_c (T_b - T_a) - \lambda_w k_m A_c (H_s - H_a) + \frac{\alpha}{m_b} r_{CO_2} \quad (3.118)$$

Donde se tiene:

$$U_b = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b}} \quad (3.119)$$

$$U_b = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b} + \frac{z_t}{k_t}} \quad (3.120)$$

Suponiendo que la resistencia térmica de las charolas es despreciable debido a su gran conductividad, ya que se utilizan metálicas, U_t y U_b son iguales y definidos como:

$$U_b = U_t = \frac{1}{\frac{1}{h_c} + \frac{z_b}{k_b}} \quad (3.121)$$

Esta suposición permite agrupar los dos elementos de Q_{sen} de la ecuación (3.119) en solo uno. La integración de la ecuación (3.118) para cada intervalo de tiempo entre muestreo, que puede estar comprendido únicamente por los valores inicial y final, permite la estimación numérica (función *Solver* de Microsoft Excel) del coeficiente global de transferencia de calor de la charola al *headspace* del biorreactor, U_t .

Nomenclatura

Símbolo	Descripción	Valor y unidades	Fuente o referencia
\dot{A}_c	Area específica de transferencia de calor	m^2	Variable de operación
CO_2	CO_2 producido	$mol \cdot g_{is}^{-1}$	Variable de operación
CO_{2max}	Máximo CO_2 producido	$mol \cdot g_{is}^{-1}$	Variable de operación
Cp_b	Capacidad calorífica del lecho de fermentación	$2.568 J \cdot g^{-1} \cdot K^{-1}$	Calculado
H_a	Contenido de humedad en el aire que fluye	g/g aire seco	Estimado usando T_a
$H_{a,0}$	Contenido de humedad inicial en aire que fluye, modelo	g/g aire seco	Estimado usando T_a
h_c	Coefficiente de transferencia de calor de la charola	$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$	Estimado por balance de energía
H_s	Contenido de humedad en aire superficie del lecho	g/g aire seco	Estimado usando T_b
$H_{s,0}$	Cont. de humedad inicial, aire superficie lecho modelo	g/g aire seco	Estimado usando T_b
k_b	Conductividad del lecho de fermentación	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$	Calculado
k_m	Coefficiente convectivo de transferencia de masa	$g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	Estimado por balance de agua
m_b	Masa de soporte inerte	g_{is}	Variable de operación
Mw_{CO_2}	Peso molecular del CO_2	$44.01 g \cdot mol^{-1}$	Conocido
Mw_w	Peso molecular del agua	$18 g \cdot mol^{-1}$	Conocido
Mw_X	Peso molecular de la biomasa	$24.9 g \cdot mol^{-1}$	[8]
Q_{acum}	Calor acumulado en el lecho de fermentación	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Medido por T_b
Q_{evap}	Calor removido por evaporación de agua	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por balance de agua
Q_{met}	Calor metabólico generado	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Calculado por CO_2 producido
$Q_{sen,b}$	Calor sensible transferido desde fondo de la charola	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por balance de energía
$Q_{sen,est}$	Calor sensible transferido de la charola, estimado	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por modelo
$Q_{sen,exp}$	Calor sensible transferido de la charola, experimental	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Calculado por balance
$Q_{sen,t}$	Calor sensible transferido desde superficie de la charola	$J \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por balance de energía
r_{CO_2}	Tasa de producción de CO_2	$mol \cdot g_{is}^{-1} \cdot h^{-1}$	Variable medida
T_a	Temperatura del aire que fluye	$^{\circ}C$	Variable de operación
$T_{a,0}$	Temperatura inicial del aire que fluye del modelo	$30^{\circ}C$	Parámetro del modelo
T_b	Temperatura del lecho de fermentación	$^{\circ}C$	Variable de operación
$T_{b,0}$	Temperatura inicial del lecho de fermentación, modelo	$30^{\circ}C$	Parámetro del modelo
T_{out}	Temperatura del aire a la salida del biorreactor	$^{\circ}C$	Variable de operación
T_s	Temperatura de la superficie del lecho de fermentación	$^{\circ}C$	Variable de operación
U_b	Coefficiente global de transferencia de calor del lecho	$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$	Despreciado, balance de energía
U_t	Coefficiente global de transferencia de calor de la charola	$W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$	Estimado por balance de energía
$W_{b,i}$	Contenido de agua inicial en el lecho de fermentación	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Medido
$W_{b,j}$	Contenido de agua final en el lecho de fermentación	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Medido
$W_{evap,est}$	Agua evaporada, estimada	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por modelo
$W_{evap,exp}$	Agua evaporada, experimental	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Calculado por balance de agua
$W_{evap,i,j}$	Agua evaporada	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Estimado por balance de agua
$W_{met,i,j}$	Agua metabólica	$g \cdot g_{is}^{-1}$	Calculado por CO_2 producido
x_n	Fracción másica del componente "n"	Adimensional	Medido
Y_{NH_3/CO_2}	Coefficiente de rendimiento para amoníaco (NH_3) - CO_2	$mol NH_3 \cdot mol CO_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
Y_{O_2/CO_2}	Coefficiente de rendimiento para oxígeno (O_2) - CO_2	$mol O_2 \cdot mol CO_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
Y_{S/CO_2}	Coefficiente de rendimiento para sustrato (S) - CO_2	$Cmol S \cdot mol CO_2^{-1}$	Supuesto o medido
Y_{X/CO_2}	Coefficiente de rendimiento para biomasa (X) - CO_2	$Cmol X \cdot mol CO_2^{-1}$	Supuesto o medido
Y_{XS}	Coefficiente de rendimiento biomasa (X) - sustrato (S)	$Cmol X \cdot mol S^{-1}$	Medido
Y_{W/CO_2}	Coefficiente de rendimiento para agua (W) - CO_2	$mol W \cdot mol CO_2^{-1}$	Calculado por estequiometría
z_b	Altura del lecho de fermentación	m	Variable de operación
α	Calor producido por mol de CO_2 generado	$460 \times 10^3 J \cdot mol^{-1}$	[6]
λ_w	Calor latente de vaporización del agua	$J \cdot g^{-1}$	[6]
μ_{air}	Viscosidad del aire en el "headspace" del biorreactor	$1.863 \times 10^{-3} g \cdot cm^{-1} \cdot s^{-1}$	[6]
μ_{CO_2}	Tasa específica de producción de CO_2	h^{-1}	Calculado
ρ_n	Densidad densidad del componente "n"	$g \cdot cm^{-3}$	[18]
ρ_{air}	Densidad del aire en el "headspace" del biorreactor	$0.00086 g \cdot cm^{-3}$	[8]

Problema 3.6 Cálculos en intercambiadores de calor

Miguel Sergio Hernández Jiménez

Introducción

Los intercambiadores de calor son equipos fundamentales en la industria, ya sea para recuperar energía a partir de vapor y de esta manera calentar otra corriente, o para enfriar flujos de otros procesos. Por lo que el vapor y el agua de enfriamiento son servicios indispensables en la industria. De tal manera que una de las aplicaciones más concretas para un estudiante de ingeniería son los cálculos en intercambiadores de calor (Badger, 1973).

Los cálculos en intercambiadores permiten mejorar su eficiencia, así como determinar su operación óptima. Para poder realizar éstos, es necesario comprender su funcionamiento. Así que es importante para los estudiantes estar familiarizados con conceptos tales como: temperatura, coeficiente global de transferencia de calor, factor de ensuciamiento. Así como las características de operación, las cuales pueden ser co-corriente o contracorriente (figura 3.11).

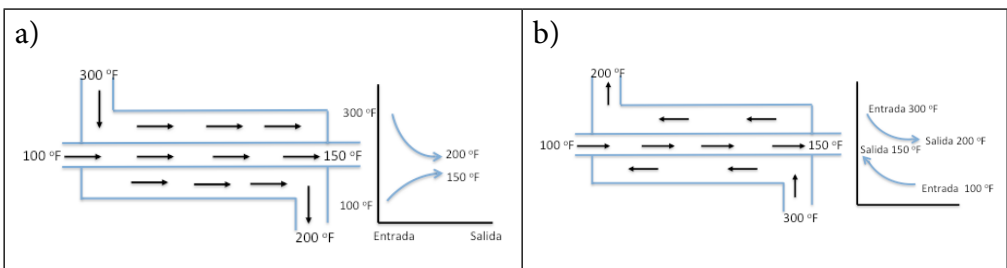


Figura 3.11. Intercambiador de tubos concéntricos operado (a) a co-corriente (paralelo) y (b) a contracorriente. Adaptado de Kern (Kern, 2008).

En un intercambiador por lo general tendremos dos fluidos; ya sea corriendo en forma paralela (co-corriente) o en sentido opuesto (contra-corriente), como se puede apreciar en la figura 3.11. Dado que solo podemos conocer las temperaturas a la entrada y salida del intercambiador, tendremos dos registros de ingreso y dos de escape; lo cual nos dará dos gradientes de temperatura ΔT_1 y ΔT_2 . La transferencia de calor se debe a estos y de ahí su importancia.

Como se puede apreciar en la figura 3.11,a) y b), la diferencia de temperatura entre los dos fluidos varía a lo largo del intercambiador, y dicha modificación es no lineal, por lo que una estimación de la temperatura promedio se puede obtener mediante la metodología de la **media logarítmica de la diferencia de temperatura (MLDT)**. La cual está definida por la siguiente ecuación:

$$MLDT = \frac{\Delta T_2 - \Delta T_1}{\ln\left(\frac{\Delta T_2}{\Delta T_1}\right)} \quad (3.122)$$

Con los datos de la figura 3.11, realizaremos el cálculo de la MLDT para un fluido que entra caliente a un intercambiador de tubos concéntricos, y uno frío que absorbe calor por esta acción, tanto a co-corriente como a contracorriente. Para lo cual realizaremos el próximo análisis a partir de los siguientes datos (tabla 3.11):

Tabla 3.11. Ejemplo de cálculo de MLDT en intercambiador tubular.

Datos	
Temperatura de entrada del fluido caliente (E_{fc}) = 150 °C Temperatura de salida del fluido caliente (S_{fc}) = 93 °C Temperatura de entrada del fluido frío (E_{ff}) = 37 °C Temperatura de salida del fluido frío (S_{ff}) = 65 °C	
Operación a co-corriente o paralelo	Operación a contracorriente
$\Delta T_2 = (E_{fc}) - (E_{ff}) = 150 - 37 = 113 \text{ °C}$ $\Delta T_1 = (S_{fc}) - (S_{ff}) = 93 - 65 = 28 \text{ °C}$ por lo tanto: $\Delta T_2 - \Delta T_1 = 85 \text{ °C}$ de tal manera que: $MLDT = \frac{85}{\ln\left(\frac{113}{28}\right)} = 60.92 \text{ °C}$	$\Delta T_2 = (E_{fc}) - (S_{ff}) = 150 - 65 = 85 \text{ °C}$ $\Delta T_1 = (S_{fc}) - (E_{ff}) = 93 - 37 = 56 \text{ °C}$ por lo tanto: $\Delta T_2 - \Delta T_1 = 29 \text{ °C}$ de tal manera que: $MLDT = \frac{29}{\ln\left(\frac{85}{56}\right)} = 69.49 \text{ °C}$

Adaptado de Kern (Kern, 2008).

Como se podrá dar cuenta el lector, existe una diferencia en el gradiente de temperaturas al operar en flujo paralelo y contracorriente, esta desigualdad tendrá un efecto directo sobre la eficiencia de operación del intercambiador.

Finalmente, la expresión matemática que describe la transferencia de calor en un intercambiador tubular que se obtiene a partir de la ecuación de Fourier, es la siguiente:

$$\dot{Q} = U A_{\text{sup}} \Delta T_{\text{ln}} \quad (3.123)$$

Donde:

\dot{Q} es el flujo de calor,

U , es el coeficiente global de transferencia de calor,

ΔT_{ln} es la temperatura media logarítmica,

A_{sup} es el área a través de la cual se da la transferencia de calor.

Problema propuesto

En un proceso de arrastre de vapor, se requiere para realizar el procedimiento: evaporar etanol a 78 °C, dentro de un intercambiador de calor de doble tubo con flujo paralelo a una tasa de 0.05 kg/s, empleando un fluido de calentamiento (aceite) el cual entra a una temperatura de 115 °C. El área superficial de transferencia de calor y el coeficiente global de transferencia de calor son 6.2 m² y 320 w/m² °C, respectivamente. La capacidad calorífica de fluido de calentamiento es $C_p = 2\,200 \text{ J/kg } ^\circ\text{C}$ y el calor de vaporización del etanol es $\Delta H_{\text{fg}} = 846 \text{ kJ/kg}$.

- a. Determine la temperatura de salida del aceite
- b. El flujo másico del fluido de calentamiento

Solución del problema

Suposiciones:

- i. Estado estacionario
- ii. Intercambiador bien aislado
- iii. Energía cinética y potencial despreciables
- iv. Propiedades de los fluidos constantes

Datos:

- Temperatura de alimentación del etanol 18 °C
- Flujo másico del etanol $\dot{m} = 0.4 \text{ kg/s}$
- Calor de vaporización = 846 kJ/kg
- Temperatura de entrada del fluido de calentamiento = 115 °C
- Capacidad calorífica del aceite $C_p = 2\,200 \text{ J/kg } ^\circ\text{C}$
- Área de transferencia de calor (área superficial) = 6.2 m²
- Coeficiente global de transferencia de calor (U) = 320 W/ m² °C

Solución empleando el método de (MLDT)

a) Determinar la temperatura de salida del aceite.

Este dato se puede calcular empleando la ecuación (3.123): $\dot{Q} = U A_{\text{sup}} \Delta T_{\text{in}}$.

Donde el flujo de calor \dot{Q} , se obtiene a partir de,

$$\dot{Q} = \dot{m} \Delta H_{\text{fg}} \quad (3.124)$$

de tal manera que:

$$\dot{Q} = 0.05 \frac{\text{kg}}{\text{s}} \left(846\,000 \frac{\text{J}}{\text{kg}} \right) = 42\,300 \frac{\text{J}}{\text{s}}$$

Sustituyendo este valor en la ecuación (3.123) y despejando tenemos:

$$\Delta T_{\text{in}} = \frac{\dot{Q}}{U A_{\text{sup}}} = \frac{42\,300 \frac{\text{J}}{\text{s}}}{320 \frac{\text{J}}{\text{s m}^2 \text{ } ^\circ\text{C}} (6.2 \text{ m}^2)} = 21.32 \text{ } ^\circ\text{C}$$

dado que ya conocemos la ΔT_{in} , además sabemos que el intercambiador opera en flujo paralelo, entonces con la ecuación (3.122) y la información de la tabla 3.11 sabemos que:

$$\text{MLDT} = \frac{(\Delta T_2) - \Delta T_1}{\ln \left(\frac{\Delta T_2}{\Delta T_1} \right)} = 21.32 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Temperatura del fluido caliente (Efc) = 115 °C

Temperatura del fluido caliente, la cual se desconoce y se representa con, Sfc

Temperatura del fluido frío (Eff) = 18 °C

Temperatura del fluido frío (Sff) = 78 °C

$$T_2 = (Efc) - (Eff) = 115 - 18 = 97 \text{ °C}$$

$$T_1 = (Sfc) - (Sff) = Sfc - 78$$

De tal manera que:

$$\frac{150 - \Delta T_1}{\ln\left(\frac{150}{\Delta T_1}\right)} = 21.32 \text{ °C}$$

Así que sustituyendo ΔT_1 tendremos:

$$\frac{150 - (Sfc - 78)}{\ln\left(\frac{150}{(Sfc - 78)}\right)} = 21.32 \text{ °C}$$

Reordenando la expresión anterior tenemos:

$$150 - (Sfc - 78) = 21.32 \text{ °C} * \ln\left(\frac{150}{Sfc - 78}\right)$$

$$150 (Sfc) - 11700 = 21.32 * (\ln 150 - \ln(Sfc - 78))$$

$$150 (Sfc) - 11700 = 21.32 * (5.01 - \ln(Sfc) - 4.35)$$

$$150 (Sfc) + \ln(Sfc) = 11700 + 21.32 * (5.01 - 4.35)$$

$$150 (Sfc) + 21.32 * \ln(Sfc) = 11720.60$$

La ecuación anterior se resolvió mediante iteración utilizando Excel, obteniendo que: la temperatura de salida del fluido de calentamiento es de **77.52 °C**.

b) El flujo másico del fluido de calentamiento se determina a partir de:

$$\dot{Q} = \dot{m}_a C_p \Delta T = \dot{m}_a C_p (Efc - Sfc)$$

Por lo tanto, despejando \dot{m}_a tenemos:

$$\dot{m}_a = \frac{\dot{Q}}{C_p (Efc - Sfc)}$$

sustituyendo valores:

$$\dot{m}_a = \frac{42\,300 \frac{J}{s}}{2200 \frac{J}{kg \text{ } ^\circ C} (115 - 77.52 \text{ } ^\circ C)} = 0.513 \frac{kg}{s}$$

Un ejercicio comparativo adicional sería realizar un nuevo cálculo, pero ahora considerando que el intercambiador opera a contracorriente.

Problema 3.7 Transferencia de masa gas-líquido acoplada a consumo de oxígeno microbiano

Miguel Sergio Hernández Jiménez

Introducción

Dentro del plan de estudio de la Licenciatura en Ingeniería Biológica, se tienen cursos de transferencia de masa y reactores biológicos. Sin embargo, hay pocos casos para relacionar los conceptos aprendidos en dichas materias y entender su importancia. Un ejemplo de cómo correlacionar lo asimilado en la asignatura de transferencia de masa y aplicarlo en el curso de reactores biológicos es acoplar el balance de materia del oxígeno de la fase gaseosa y su intercambio a la fase líquida, para asociarlo al crecimiento microbiano.

En este problema se desarrollarán las ecuaciones que permiten obtener la velocidad de transferencia de oxígeno, desde la fase gaseosa a la líquida en reactores biológicos. Así como, un ejemplo de su aplicación.

Procesos microbianos aerobios

El oxígeno es de vital importancia en los procesos microbianos aerobios, debido al papel de éste, tanto en la oxidación de la fuente de carbono como en el desarrollo de los microorganismos (crecimiento), también en la formación de productos y CO_2 . Por esta razón, determinar los requerimientos de consumo de oxígeno en un fermentador puede ser parte esencial de la labor de un ingeniero biólogo. Dicha información permite la correcta operación del proceso, ya que la transferencia de O_2 puede ser el paso limitante. Sin olvidar que, en muchas ocasiones, la alimentación de este gas ayuda a la agitación y mezclado del cultivo microbiano. De manera general, el O_2 se suministra mediante la inyección de aire al medio de cultivo, para lo cual hay que superar la resistencia a la transferencia de masa antes de que este llegue a los microorganismos (Torres López et al, 2008). Una manera de ejemplificar como se transfiere el oxígeno del aire (fase gaseosa) al medio de cultivo (fase líquida) para llegar a los microorganismos se muestra en la figura 3.12.

Obtención de las ecuaciones para representar la transferencia de oxígeno de una burbuja a un medio de cultivo líquido

A continuación, se plantea un problema integral en donde se presenta la transferencia de materia en un sistema gas-líquido. En este problema se desea determinar la ecuación de transferencia de masa, y posteriormente acoplarlo a la tasa de consumo microbiano. Se tomará como soluto "A" al oxígeno (O_2) de la burbuja de aire, que será transferido a la fase líquida (medio de cultivo) en un proceso aerobio (figura 3.12). Sin embargo, este mismo análisis puede ser aplicado a la transferencia de cualquier otro soluto gaseoso para ser transferido a una fase líquida.

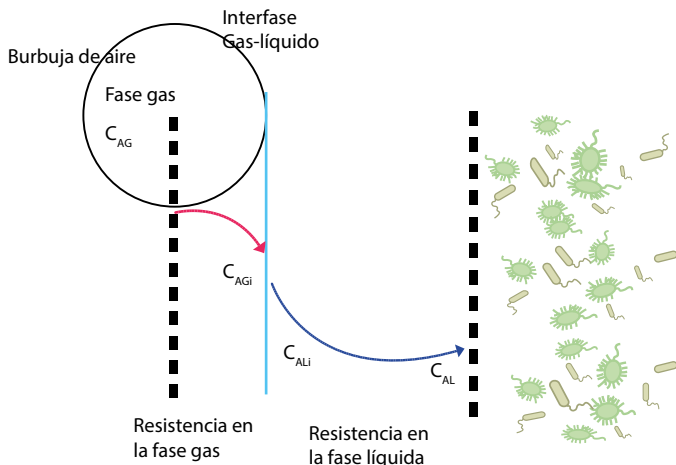


Figura 3.12. Descripción de la transferencia del oxígeno desde una burbuja de aire al medio de cultivo. Adaptado de Doran (Doran, 1998).

Definiendo las variables como:

C_{AG} = concentración de "A" en la fase gaseosa

C_{AGi} = concentración de "A" en la interfase

C_{AL} = concentración de "A" en la fase líquida

C_{ALi} = concentración de "A" en la interfase

Se asume que la transferencia va desde la fase gaseosa (burbuja) hasta la líquida, ya que el contenido de oxígeno en el aire es de alrededor de 21%. Mientras que la máxima solubilidad de este gas en agua es de 6.8 mg/L. Por lo que se plantea la ecuación de velocidad de transferencia de materia a través de la capa límite o de la interfase, de tal manera que el flujo del soluto "A" (oxígeno) desde la fase gaseosa esta descrito por la siguiente ecuación:

$$N_{AG} = K_G a (C_{AG} - C_{AG_i}) \quad (3.125)$$

Mientras que de forma análoga se tiene para la velocidad de transferencia en la fase líquida:

$$N_{AL} = K_L a (C_{AL_i} - C_{AL}) \quad (3.126)$$

Donde:

K_G es el coeficiente de transferencia de materia de la fase gaseosa;
 K_L es el coeficiente de transferencia en la fase líquida, respectivamente;
 a es el área de sección transversal.

Sin embargo, determinar las concentraciones en la interfase es prácticamente imposible, por lo que recurrimos al criterio de equilibrio. De manera general, en este punto se puede tomar en cuenta el coeficiente de partición “ m ”, el cual se define como:

$$m = \frac{C_G}{C_L} \quad (3.127)$$

Por lo tanto, en la interfase:

$$m = \frac{C_{AG_i}}{C_{AL_i}} \quad (3.128)$$

despejando C_{AG_i} :

$$C_{AG_i} = m * C_{AL_i} \quad (3.129)$$

mientras que:

$$C_{AL_i} = \frac{C_{AG_i}}{m} \quad (3.130)$$

Una vez definidas estas expresiones, retomamos el caso de la fase gaseosa, por lo que reescribimos la ecuación (3.125) teniendo:

$$\frac{N_{AG}}{K_G a} = (C_{AG} - C_{AG_i}) \quad (3.131)$$

Si multiplicamos ambos lados de la ecuación (3.131) por $1/m$ tenemos:

$$\left(\frac{N_{AG}}{m * K_G a} \right) = \left(\frac{C_{AG}}{m} - \frac{C_{AG_i}}{m} \right) \quad (3.132)$$

Mientras que para la fase líquida retomamos la ecuación (3.126) y la reescribimos, así tenemos que:

$$\frac{N_{AL}}{K_L a} = (C_{AL_i} - C_{AL}) \quad (3.133)$$

si multiplicamos la ecuación (3.133) por m tenemos:

$$m * \frac{N_{AL}}{K_L a} = m * (C_{AL_i} - C_{AL})$$

o

$$m * \frac{N_{AL}}{K_L a} = (m * C_{AL_i} - m * C_{AL}) \quad (3.134)$$

ahora si sumamos las ecuaciones (3.131) y (3.134) tenemos:

$$\frac{N_{AG}}{K_G a} + \frac{m * N_{AL}}{K_L a} = (C_{AG} - m * C_{AG_i}) + (m * C_{AL_i} - m * C_{AL}) \quad (3.135)$$

sustituyendo la condición de equilibrio, ecuación (3.129), en (3.135) tenemos:

$$\frac{N_{AG}}{K_G a} + \frac{m * N_{AL}}{K_L a} = (C_{AG} - C_{AG_i}) + (m * C_{AL_i} - m * C_{AL}) \quad (3.136)$$

$$\frac{N_{AG}}{K_G a} + \frac{m * N_{AL}}{K_L a} = (C_{AG} - \cancel{m * C_{AL_i}}) + (\cancel{m * C_{AL_i}} - m * C_{AL})$$

Eliminando términos semejantes obtenemos una ecuación donde se suprimen las concentraciones en la interfase; que, como ya se mencionó, son muy complejas de determinar:

$$\frac{N_{AG}}{K_G a} + \frac{m^* N_{AL}}{K_L a} = (C_{AG} - m^* C_{AL}) \quad (3.137)$$

Como no hay acumulación en la interfase, entonces $N_{AG} = N_{AL} = N_{Ai}$; por lo tanto, la ecuación (3.137) se puede reescribir para la fase gaseosa de la siguiente forma:

$$N_{AG} \left(\frac{1}{K_G a} + \frac{m}{K_L a} \right) = (C_{AG} - m^* C_{AL}) \quad (3.138)$$

Análogamente para la fase líquida retomamos las ecuaciones (3.132) y (3.134) y las sumamos:

$$\left(\frac{N_{AG}}{m^* K_G a} \right) + \frac{N_{AL}}{K_L a} = \left(\frac{C_{AG}}{m} - \frac{C_{AG_i}}{m} \right) + (C_{AL_i} - C_{AL}) \quad (3.139)$$

Sustituyendo la condición de equilibrio, ecuación (3.130), en la expresión (3.139) tenemos:

$$\left(\frac{N_{AG}}{m^* K_G a} \right) + \frac{N_{AL}}{K_L a} = \left(\frac{C_{AG}}{m} - \frac{C_{AG_i}}{m} \right) + \left(\frac{C_{AG_i}}{m} - C_{AL} \right) \quad (3.140)$$

Simplificando mediante la eliminación de términos semejantes, obtenemos:

$$\left(\frac{N_{AG}}{m^* K_G a} \right) + \frac{N_{AL}}{K_L a} = \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad (3.141)$$

Retomando la suposición de que $N_{AG} = N_{AL} = N_{Ai}$, entonces la ecuación (3.137) se puede reescribir para el líquido como:

$$\left(\frac{N_{AL}}{m^* K_G a} \right) + \frac{N_{AL}}{K_L a} = \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad (3.142)$$

Factorizando podemos reescribir la ecuación (3.142), obteniendo:

$$N_{AL} \left(\frac{1}{m^* K_G a} + \frac{1}{K_L a} \right) = \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad (3.143)$$

Donde:

$K_G a$ es el coeficiente de transferencia local en el gas;

$K_L a$ es el coeficiente de transferencia local en el líquido.

Sin embargo, los coeficientes de transferencia combinados de las ecuaciones (3.138) y (3.143) pueden utilizarse para definir los coeficientes globales de transferencia de materia en la fase gaseosa K_G ; que se define mediante la siguiente expresión:

$$\frac{1}{K_G a} = \left(\frac{1}{K_G a} + \frac{m}{K_L a} \right) \quad (3.144)$$

mientras que el coeficiente global para la fase líquida K_L esta dado por:

$$\frac{1}{K_L a} = \left(\frac{1}{m^* K_G a} \right) + \frac{1}{K_L a} \quad (3.145)$$

Entonces, sustituyendo los coeficientes globales por los locales combinados, tenemos que, la ecuación (3.138) y (3.143) pueden ser reescritas como:

$$N_{AG} = K_G a (C_{AG} - m^* C_{AL}) \quad (3.146)$$

$$N_{AL} = K_L a \left(\frac{C_{AG}}{m} - C_{AL} \right) \quad (3.147)$$

donde las ecuaciones (3.146) y (3.147) nos permiten determinar la velocidad de transferencia de masa en sistemas gas-líquido. Y dado que dichas expresiones están en función de condiciones de equilibrio, se pueden reescribir como:

$$m^* C_{AL} = C_{AG}^* \quad (3.148)$$

mientras que:

$$\frac{C_{AG}}{m} = C_{AL}^* \quad (3.149)$$

así que sustituyendo (3.148) y (3.149) en (3.146) y (3.147), respectivamente, tenemos:

$$N_{AG} = K_G a (C_{AG} - C_{AG}^*) \quad (3.150)$$

$$N_{AL} = K_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (3.151)$$

y dado que en condiciones de estado estacionario $N_{AG} = N_{AL} = N_A$, con este argumento las ecuaciones (3.150) y (3.151) pueden ser reescritas como:

$$N_A = K_G a (C_{AG} - C_{AG}^*) \quad (3.152)$$

$$N_A = K_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (3.153)$$

Las ecuaciones (3.152) y (3.153) representan la velocidad de transferencia de materia del componente "A", considerando la resistencia a la transferencia de masa en la película de la fase gaseosa o en la de la fase líquida. Para el caso del oxígeno (como componente "A"), que es un compuesto poco soluble, tenemos que la principal resistencia se da en la fase líquida y es la dominante. Por tanto, la transferencia macroscópica de O₂, puede ser reordenada a partir de la ecuación (3.153), obteniendo la siguiente expresión:

$$RO_2 = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) \quad (3.154)$$

Donde:

RO₂ es la velocidad de transferencia de oxígeno

k_La, es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, determinado experimentalmente;

C_{AL}^{*} es la concentración en equilibrio de la presión parcial del oxígeno en el seno de la fase gaseosa;

C_{AL} es la concentración en el seno del líquido.

Acoplamiento de la transferencia de oxígeno con la producción de biomasa

Por otro lado, tenemos que el consumo de oxígeno en sistemas biológicos está relacionado con la velocidad de transferencia; sin embargo, también es una función de varios factores, tales como: la especie de los microorganismos, la fase de crecimiento, la fuente de carbono, entre otros. Podemos suponer que para sistemas aerobios (Quintero Ramírez, 1981).

$$\left(\text{Número}_{\text{celulas}} \approx O_2 \text{ consumido} \right) \quad (3.155)$$

De tal manera que la velocidad de utilización de O₂ por número células se conoce como: consumo específico de oxígeno ($q_0 = \left[\frac{g}{g \cdot s} \right]$); por lo tanto, la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen ($Q_0 = \left[\frac{g}{L \cdot s} \right]$), se puede obtener al multiplicar la del consumo específico por la cantidad de biomasa:

$$\left(Q_0 \right) = q_0 * X \quad (3.156)$$

Donde X representa la biomasa en unidades $\left[\frac{g}{L} \right]$

De esta manera, una vez definida la velocidad de consumo de oxígeno microbiano con las siguientes suposiciones:

- i. Estado estacionario.
- ii. No hay acumulación de O_2 en ninguna parte del reactor.
- iii. La velocidad de transferencia desde las burbujas es igual a la de consumo de las células.

Podremos igualar:

$$RO_2 = Q_0 \quad (3.157)$$

Así que si retomamos las ecuaciones (3.154) y (3.156) e igualando, tenemos una expresión para determinar la velocidad específica de consumo de oxígeno:

$$k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) = q_0 * X \quad (3.158)$$

Donde, $k_L a$, se utiliza para caracterizar la capacidad de transferencia de oxígeno en los reactores biológicos (fermentadores). Es importante recordar que este se obtiene de manera experimental.

A continuación, aplicaremos las ecuaciones desarrolladas a un sistema para la obtención de biomasa.

Problema

Una cepa de *Lactococcus lactis* se hace crecer en un reactor de 20 m^3 empleando un sistema de fermentación con aireación externa, la importancia de su producción radica en que esta línea puede ser utilizada en la fabricación de quesos tipo: Camembert, Brie, Parmesano y Roquefort entre otros. Bajo las condiciones de operación, el valor de $k_L a$ alcanzado fue de $40.68 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ (Soler & Buitrago, 2010). La solubilidad del oxígeno en este medio de cultivo es de aproximadamente $7.5 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-3}$ y la tasa específica de consumo de este gas para esta cepa es de $15.8 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

a) **Determinar la máxima cantidad de biomasa que se puede obtener con estas condiciones de operación.**

Solución

Basados en la ecuación (3.158), cuando no hay oxígeno en el medio líquido $C_{AL} = 0$; es decir, el consumo es total, se puede asumir que la concentración de biomasa es máxima por lo que la ecuación puede reescribirse como:

$$k_L a(C_{AL}^*) = q_0 * X_{max} \quad (3.159)$$

De tal manera que despejando X_{max} tenemos:

$$X_{max} = \frac{k_L a(C_{AL}^*)}{q_0} \quad (3.160)$$

Sustituyendo los valores conocidos tenemos que:

$$X_{max} = \frac{40.68 \text{ h}^{-1} (7.5 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-3})}{5.056 \times 10^{-4} \text{ kg g}^{-1} \text{ h}^{-1}} = 603.44 \frac{\text{g}}{\text{m}^3} \quad (3.161)$$

Sabiendo que el reactor tiene 20 m^3 , entonces la cantidad de biomasa obtenida es de 12.68 kg de *Lactococcus lactis*.

Problema 3.8 Cultivo continuo

Rodolfo Quintero Ramírez

Introducción

En la Ciudad de Cuernavaca existía una planta productora de antibióticos que operaba tres fermentadores de 120 m^3 , cada uno, agitados mecánicamente con un motor de 120 HP y una aeración adecuada ($90 \text{ m}^3/\text{minuto}$); localizada en una zona donde hay abundante disponibilidad de agua fría (10°C).

La empresa cerró hace varios años, y ahora un grupo de inversionistas desea comprar la planta para producir levadura como fuente de proteína animal y unicelular, utilizando como materia prima la melaza de la caña de azúcar, disponible en abundancia en la zona.

Sin embargo, la empresa no tiene experiencia alguna en procesos de fermentación y, aunque han estudiado documentos de algunos años atrás, saben lo siguiente: el proceso es continuo, con una alta productividad, el producto es de calidad suficiente para ser utilizado como aditivo en la alimentación animal (pollos y cerdos). También han encontrado en la literatura comercial y de difusión científica que las plantas industriales de proteína unicelular tienen capacidades de 10 000 a 50 000 ton/año.

Para conocer la potencialidad del equipo de fermentación que se les ofrece, la empresa interesada decide contratar una compañía de consultoría para que haga una estimación sobre ¿cuál sería la capacidad de producción?

Solución

De acuerdo a la literatura (Quintero Ramírez, 1981), en los procesos de producción de proteína unicelular, el objetivo es operar a la máxima productividad posible; y son dos los factores limitantes: la transferencia de masa y de calor. Por ello la empresa consultora decide hacer una estimación de ambas basados en los datos disponibles, la productividad reportada es de $3.5\text{-}4 \text{ g/L-h}$:

Fermentador. El volumen que se menciona es de 120 m^3 , pero en fermentaciones los tanques se usan al 75% de su volumen, es decir 90 m^3 . Considerando que el reactor tiene di-

seño estándar entonces la relación $H/D=3$ se aplica para ese volumen: esto es el diámetro (D) de 3.37 m y la altura (H) de 10.11 m.

Levadura. Para producción de proteína unicelular se obtuvieron los siguientes datos:

Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*

Sustrato: melaza

$Y = 0.475$ g biomasa/g sustrato

$T = 30^\circ\text{C}$

$\text{pH} = 7$

$\mu = 0.3\text{-}0.4\text{h}^{-1}$

$Y_{\text{O}_2} = 1.02$ g^{O₂}/g

$Y_{\text{kcal}} = 3.87$ kcal/g

Estrategia. Con la información anterior, se procede a calcular la transferencia de oxígeno que nos puede proporcionar el equipo operando a condiciones realistas, para después estimar la productividad del sistema.

Para el cálculo de la transferencia de oxígeno, se requiere el coeficiente de transferencia de masa $k_L a$ y el ΔC .

El $k_L a$ se calculó utilizando la siguiente correlación:

$$k_L a = 2.6 \cdot 10^{-2} \left(\frac{P}{V} \right)^{0.4} \cdot v_s^{0.5} \quad (3.162)$$

Por lo tanto, se obtiene en unidades de s^{-1} , y en donde las unidades de P son watts, V en m^3 y v_s en m/s . El valor de P se tomó del tamaño del motor de 120 HP, es decir 89 400 Watts pero operando al 80% de su capacidad, y de ese modo se calcula como sigue:

$$v_s = \text{VVM}/\pi D^2/4 = 0.17 \text{ m/s},$$

Y por tanto el $k_L a$ es:

$$k_L a = 2.6 \times 10^{-2} \cdot \left(\frac{71\,520 \text{ Watts}}{90 \text{ m}^3} \right)^{0.4} \cdot (0.17 \text{ m/s})^{0.5} \quad (3.163)$$

Para el cálculo de ΔC , se estimó la concentración en el equilibrio de oxígeno disuelto en agua a 30°C , utilizando la ecuación:

$$C_{O_2} = 14.16 - 0.394 T + 0.007714 T^2 - 0.00006467 T^3 \quad (3.164)$$

El valor que se obtiene es de 7.54 mg O₂/L. Pero tomando en consideración que el tanque opera a 0.5 atmosferas (atm) de sobrepresión, además de que la altura del agua es de 10.11 m, lo que equivale a 1.01 atm. Por tanto, la concentración en el equilibrio de oxígeno disuelto en el agua es de 11.3 mg O₂/L y la concentración de oxígeno disuelto en agua es de 1 mg O₂/L. Con estas consideraciones el ΔC vale 10.3 mg O₂/L. Entonces la transferencia de oxígeno es de 5 711.7 mg O₂/L.

Con esta información se procede a calcular la productividad que es igual a:

$$\begin{aligned} \text{Productividad} &= \text{transferencia de masa} / Y_{O_2} \\ \text{Productividad} &= 5.6 \text{ g/L-h} \end{aligned}$$

Y considerando que el tanque opera con un volumen de 90 000 litros la producción sería de 494 118 g/h, y en un año (330 días) se elaborarían 3 914.06 ton/año; pero como son tres tanques en la planta se podrían obtener 11 742.2 ton/año.

Este es un tamaño de planta industrial acorde con la literatura.

Ahora bien, con respecto a la transferencia de calor, primero se calcula la cantidad de este a remover que es igual a $\mu \cdot X \cdot Y/k$, y en este caso es de (5.49g/L-h) (3.87 kcal/g) = 21.25Kcal/L-h.

Del fermentador de 90 000 litros se deben remover 1 912 500 Kcal/h. Para transferir este calor tenemos agua de enfriamiento a 10°C, y para fines de cálculo suponemos que sale del sistema a 27 °C, o sea ΔT de 17°C.

Para el agua el Cp es de 1 Kcal/kg-°K

Y el flujo requerido es de 112 500 kg/h o sea 112.5 m³/h; pero como son tres tanques el flujo total requerido es de 337.5 m³/h.

Comentario. Este es un caudal muy grande de agua y habría que corroborar que en el sitio esté disponible, lo más probable es que no; por lo que una solución es instalar un sistema de enfriamiento de agua con recirculación.

Respuesta. Tomando en consideración las características de la planta, la empresa tiene el potencial de producir casi 12 000 ton/año; pero, muy probablemente la limitante en la elaboración sea la disponibilidad de agua fría y por lo tanto la producción sería menor.

Problema 3.9 Producción de un bioinsecticida (Bt)

Rodolfo Quintero Ramírez

Introducción

La bacteria *Bacillus thuringiensis*, es un Gram+ que se encuentra en prácticamente todas las regiones del mundo (bosques, praderas, etc.). Este microorganismo tiene la capacidad de esporular cuando las condiciones ambientales le son adversas (falta de nutrientes, por ejemplo), y cuando eso sucede produce una proteína, que por las características que tiene se cristaliza intracelularmente, a esta se le denomina δ -endotoxina. La importancia de esta biomolécula radica en el hecho de que si es ingerida por ciertos insectos (lepidópteros y dípteros), por ácaros u otro tipo de organismos de las denominadas plagas en el agro; las mata, es decir, actúa como un bioinsecticida.

Una característica distintiva de la δ -endotoxina, al observarla en el microscopio, es la forma de sus cristales, por ello otra manera de denominarlos es proteína CRY (“crystal”, por su nombre en inglés). En varios casos la forma del cristal se asocia al insecto objetivo, por ejemplo: los rómbicos en general son eficaces contra lepidópteros.

La δ -endotoxina se produce intracelularmente junto con la espora, en muchas ocasiones al final del cultivo se obtiene una mezcla de células, esporas y cristales proteicos. Muchos de los bioinsecticidas que se usan comercialmente utilizan esta combinación, mientras que en otros casos se prefiere purificar la proteína CRY y el producto resultante la tiene en mayor concentración.

En el laboratorio de un biotecnólogo, hace varios años, una investigadora asociada (experta en biología molecular); tuvo la curiosidad de empezar a estudiar y entender el mecanismo de acción de la δ -endotoxina. Las investigaciones de este grupo dieron origen a una publicación de la FAO (Bravo & Quintero, 1993), en la cual se describen en términos generales lo que sucede. A continuación, se presenta el proceso de acción de la δ -endotoxina (figura 3.13) y las diferentes etapas en que se lleva a cabo en el interior del insecto susceptible:

- Primero la larva del insecto debe ingerir el cristal (δ -endotoxina), que en su estado natural no es toxica al insecto.
- Una vez que está en el tracto digestivo se disuelve y es hidrolizada por proteasas del propio insecto, obteniéndose una proteína que ahora es activa y tóxica para este organismo.

- La proteína activada continua su trayecto hasta llegar al intestino, ahí ésta reconoce receptores específicos uniéndose a ella y generando un poro que tiene como efecto la hinchazón de las células de este órgano.



Figura 3.13. Proceso de acción de la δ -endotoxina, en las diferentes etapas en que se lleva a cabo en el interior de la larva de un insecto susceptible.

- Una vez que el intestino se hincha, la larva deja de comer. Si el producto (bioinsecticida) contiene esporas estas se propagan dentro de este órgano y el insecto muere. En las fotografías que se muestran a continuación (figura 3.14), se puede ver claramente el efecto de la δ -endotoxina en el intestino.

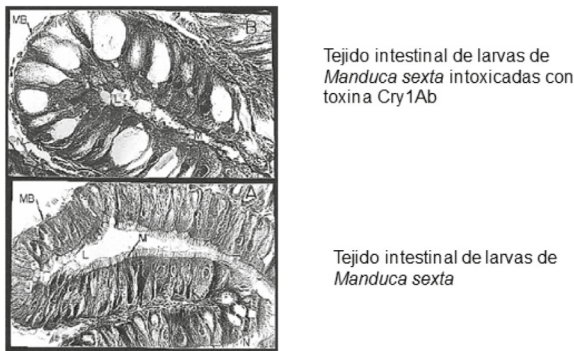


Figura 3.14. Fotografía que muestran cortes histológicos del efecto de la δ -endotoxina en tejidos del intestino de un insecto susceptible.

Problema. Escalamiento de una tecnología de fermentación

Un productor desea generar 10 mil toneladas por año de un bioinsecticida que sea efectivo contra el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), además pretende escalar una

tecnología desarrollada por una universidad mexicana, así como el diseño del fermentador para producirlo (Abarca, Martínez et al, 1992).

Con el conocimiento previo que se tenía sobre la proteína CRY, y sobre las bacterias que lo producían, se establecieron las bases de cálculo siguientes:

- La formulación de un bioinsecticida requiere que tenga 10^8 esporas/gramo o sea que en 1 tonelada de bioinsecticida hay 10^{14} esporas; así que para producir 10 mil toneladas se necesitan un total de 10^{18} esporas.
- La información para el proceso de producción se obtuvo de la referencia (Abarca, Martínez et al, 1992), que indica que: la fermentación se lleva a cabo a 30°C con un pH de 7, en un fermentador de 14 litros que opera a 800 RPM y 1 VVM de aeración obteniéndose en 24 horas 5.5×10^9 esporas/ml.
- La fase de crecimiento es de 10 horas y se alcanza una biomasa de 2.4 g/L
- Se consideró que la fermentación sería tipo batch con una duración de 30 horas: 24 de fermentación con 6 de preparación y limpieza del fermentador.
- El proceso operaría 48 semanas al año, 5 días/semana y 24 horas al día.

Base de cálculo para diseño del fermentador:

En 10 mil toneladas de bioinsecticida se requieren 10^{18} esporas, por lo tanto, el volumen de fermentación a producir es:

$$\frac{10^{18} \text{ esporas}}{5.5 \times 10^9 \text{ esporas / ml}}$$

o sea, un volumen total de fermentación de:

$$1.8181 \times 10^8 \text{ ml} = 1.818 \times 10^2 \text{ m}^3$$

Ahora se calcula el número de batch a realizar en un año:

$$\frac{48 \text{ semanas}}{\text{año}} \times \frac{5 \text{ días}}{\text{semana}} \times \frac{24 \text{ hr}}{\text{día}} \times \frac{1 \text{ fermentación}}{30 \text{ hr}} = 192 \frac{\text{fermentaciones}}{\text{año}}$$

Y el volumen de fermentación de cada batch es de $\frac{1.818 \times 10^8 \text{ l}}{192 \frac{\text{fermentaciones}}{\text{año}}} = 946.88 \text{ L}$

Por tanto, el volumen del tanque de fermentación es de 1 262.5 L, ya que en este tipo de procesos los tanques se operan al 75% de su volumen nominal.

Los fermentadores de esta escala (volumen), utilizan una relación de $H/D= 3$ (Quintero Ramírez 1981).

Por tanto, el diámetro (D) es de 0.74 m y la altura del tanque (H_T) es de 2.96 m; siendo la altura del líquido en el tanque (H) de 2.22 m.

En esta escala los fermentadores tienen 3 impulsores tipo Rushton, en este caso el diámetro del impulsor (D_i) es igual a $D_i/D = \frac{1}{3}$, $D_i= 0.247$ m

El diseño del fermentador (figura 3.15) sería:

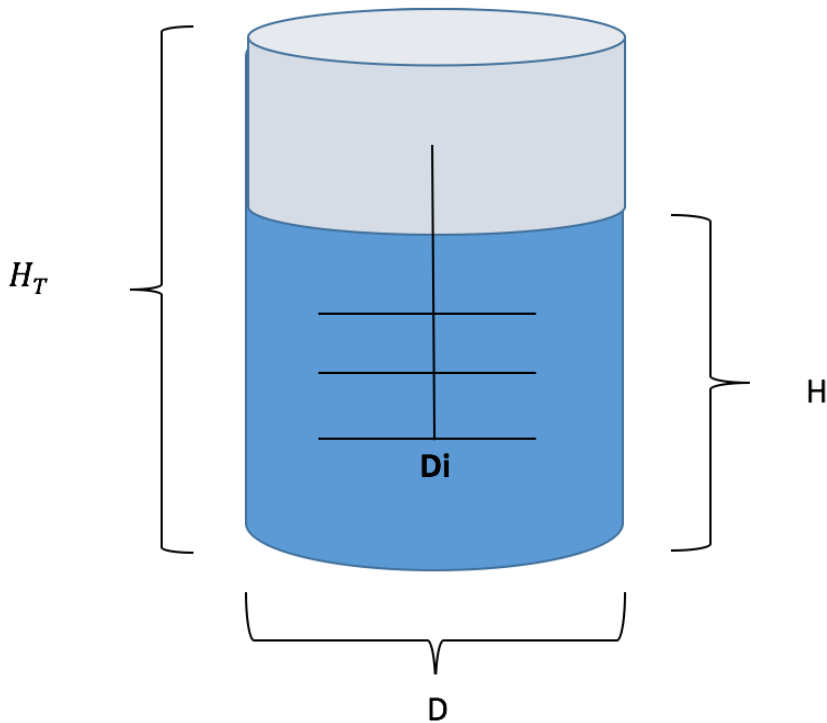


Figura 3.15. Se muestran la escala de un fermentador, para la producción de un bioinsecticida.

Escalamiento de las condiciones de operación del fermentador

Ahora, los datos de laboratorio se obtuvieron a 14 L (800 RPM y 1 VVM). Se va a escalar a 1 262.5 L. De acuerdo a la literatura (Najafpour 2007), el escalamiento se puede hacer por tres métodos (tabla 3.12):

Tabla 3.12. Métodos para realizar escalamiento en las condiciones de operación de un fermentador

Potencia por unidad de volumen constante	$\frac{P}{V} \propto (N^3 D^2)$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
Número de Reynolds similar	$N_{Re} \propto ND^2$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2$
Velocidad tangencial constante del impulsor	$\pi ND = K'$	$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_1}{D_2}$

La metodología consiste: primero en calcular las dimensiones del fermentador en menor escala, en este caso 14 L. La relación H/D para este caso es de 1.

Las dimensiones del fermentador son:

Volumen nominal 14 L

Volumen de operación 10.5 L

$$\sqrt[3]{\frac{0.105 \text{ m}^3 \times 4}{3 \pi}} = 0.1645 \text{ m}$$

H liquido= 0.1645 m

Escalamiento siguiendo el criterio 1 (tabla 3.12):

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2 \tag{3.165}$$

Lo que equivale a:

$$\left(N^3 D_i^2\right)_1 = \left(N^3 D_i^2\right)_2 \tag{3.166}$$

Sustituyendo valores:

$$(800 \text{ RPM})^3 * (0.0548)^2 = N^3 * (0.247)^2$$

Por lo tanto, el valor de N_1 es igual a 293.188 RPM.

Criterio 2 (tabla 3.12):

$$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1} \right)^2 \quad (3.167)$$

Sustituyendo valores, $\frac{800 \text{ RPM}}{N_2} = \left(\frac{0.74 \text{ m}}{0.1645 \text{ m}} \right)^2$. Por lo tanto, el valor de N_2 es igual a 39.53 RPM.

Criterio 3 (tabla 3.12):

$$(ND_i)_1 = (ND_i)_2 \quad (3.168)$$

Sustituyendo valores, $(800 \text{ RPM}) \cdot (0.0548 \text{ m}) = N_2 \cdot (0.247 \text{ m})$. Por lo tanto, el valor de N_2 es igual a 177.49 RPM.

En la aplicación de este método siempre se debe comprobar que $N_{Re} > 10^4$. Utilizando la definición del Reynold:

$$N_{Re} = \frac{D_i^2 N \rho}{\mu} \quad (3.169)$$

Evaluando para los distintos casos:

$$N_{Re1} = \frac{(5.48 \text{ cm})^2 * 13.33 \text{ RPS} * 1 \text{ g/cm}^3}{0.01 \frac{\text{g}}{\text{seg-cm}}} = 40,030$$

$$N_{Re2} = \frac{(24.7 \text{ cm})^2 * 4.8865 \text{ RPS} * 1 \text{ g/cm}^3}{0.01 \frac{\text{g}}{\text{seg-cm}}} = 298,120$$

$$N_{Re2} = \frac{(24.7 \text{ cm})^2 * 0.6588 \text{ RPS} * 1 \text{ g/cm}^3}{0.01 \frac{\text{g}}{\text{seg-cm}}} = 40,192$$

$$N_{Re\ 2}^3 = \frac{(24.7\ cm)^2 * 2.9582\ RPS * 1\ g/cm^3}{0.01 \frac{g}{seg - cm}} = 180,477$$

De estos tres resultados, se aplicaría el 1 y el 3 ya que el valor calculado para el criterio 2 es muy bajo.

Con respecto a la aeración se calcula la velocidad del aire, dejando constante la cantidad de VVM.

Vs de fermentado de 14 L = 0.83 cm/s

Vs de fermentado de 1 262.5 L = 3.66 cm/s

Como el valor de la velocidad del aire se incrementa 4.4 veces, podría utilizarse un poco menos de este tal vez entre 0.6 – 0.8 VVM.

Para evaluar que efecto tendría el escalamiento como ha sido calculado, se analiza lo siguiente, la formula general del coeficiente de transferencia de masa $k_L a$ es:

$$k_L a = k_1 \left(\frac{P}{V} \right)^\alpha (Vs)^\beta \quad (3.170)$$

Para fermentadores pequeños, y para tanques grandes $\alpha = 0.5$ y $\beta = 0.67$ para ambas escalas. En el escalamiento deseamos que el $k_L a$ permanezca constante o aumente, para los valores calculados el mejor caso sería el criterio 1.

Problema 3.10 Tratamiento anaerobio para la depuración de agua y producción de biogás

Raúl Muñoz Torre

Marcia Guadalupe Morales Ibarría

En el tratamiento biológico anaerobio de 2 000 m³/h de un agua residual industrial con una concentración de materia orgánica soluble (medida como DQO, Demanda Química de Oxígeno) de 8.000 mg O₂/L, se generan 8.000 Nm³/h de biogás. El biogás tiene un 65% (en volumen) de metano.

El diagrama del proceso de tratamiento se presenta en la figura 3.16, y se realiza en un digestor anaerobio de mezcla completa que requiere una etapa de sedimentación posterior de los microorganismos que abandonan el reactor. Una parte de la corriente concentrada en el sedimentador se recircula al digestor con el objetivo de mantener constante la concentración de microorganismos en el licor mezcla. Otra parte de la circulación concentrada (equivalente a la producción de lodo anaerobio), se purga para extraer el exceso de microorganismos que se han generado en el proceso. Puede considerarse que en el efluente tratado que abandona el sedimentador, la cantidad de estos (X_e) es despreciable.

Parámetros típicos de operación de este tipo de sistemas son:

- Rendimiento celular=0.05 kg SSV/kg DQO_{eliminada}
- SSVLM= 10 g SSV/L.
- Concentración de la corriente espesada en el sedimentador=15 g SSV/L.
- Producción de metano 0.35 NL CH₄/g DQO_{eliminada}
- Velocidad de utilización de sustrato 1.5 g DQO_{eliminada}/(g SSV.d).

Calcular:

- a. El rendimiento de eliminación de materia orgánica, y si, con esta eficiencia de eliminación obtenida, el agua tratada cumple la normativa. Si se exige que el vertido tenga una DQO inferior a 1.000 mg O₂/L.
- b. El volumen del digestor anaerobio.

- c. El flujo másico y volumétrico de lodo anaerobio que hay que purgar.
- d. La tasa de recirculación de fango anaerobio al digestor.

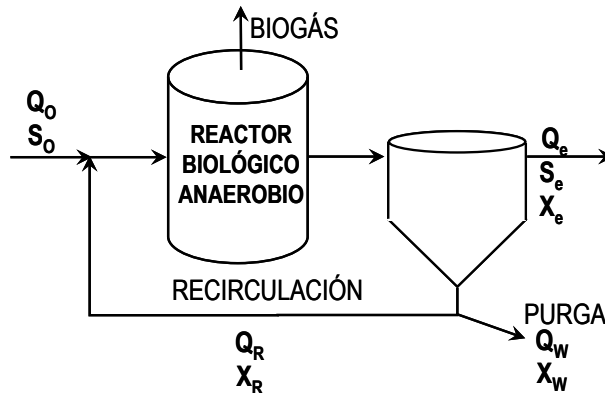


Figura 3.16. Diagrama que muestra el proceso de tratamiento de agua residual industrial en un digestor anaerobio de mezcla completa.

a.1. Rendimiento de eliminación de materia orgánica.

Podemos estimar el rendimiento de eliminación de DQO como; el flujo másico de DQO eliminada con respecto al de entrada al digestor:

$$\text{Flujo másico de DQO}_{\text{eliminada}} = 8\,000 \frac{\text{m}^3_{\text{biogás}}}{\text{h}} \cdot 0.65 \frac{\text{m}^3_{\text{CH}_4}}{\text{m}^3_{\text{biogás}}} \cdot \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{0.35 \text{ m}^3_{\text{CH}_4}} \cdot \frac{\text{h}}{2\,000 \text{ m}^3} = 7.428 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{m}^3} \quad (3.171)$$

$$\text{Rendimiento de eliminación} = \frac{7.428 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{m}^3}}{8 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{m}^3}} = 0.928 \rightarrow 92.8\% \quad (3.172)$$

a2. DQO a la salida del digestor

Si el rendimiento de eliminación de materia orgánica es del 92.8%, el líquido de salida tiene un 7.2% de la DQO del agua alimentada:

$$8.000 \frac{\text{mg DQO}_{\text{alimentada}}}{L} \cdot 0.072 = 0.576 \frac{\text{mg DQO}_{\text{salida}}}{L} < 1.000 \frac{\text{mg DQO}_{\text{salida}}}{L} \quad (3.173)$$

b. Volumen del digestor anaerobio

Aplicando la definición de velocidad de utilización de sustrato:

$$U \left[\frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{Kg SSV} \cdot d} \right] = \frac{Q_0 \cdot (S_0 - S)}{X \cdot V_{\text{digestor}}} \quad (3.174)$$

Despejando:

$$V_{\text{digestor}} = \frac{Q_0 \cdot (S_0 - S)}{X \cdot U} \quad (3.175)$$

Finalmente:

$$V_{\text{digestor}} = \frac{2000 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \cdot 24 \frac{\text{h}}{\text{d}} \cdot 7.428 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{m}^3}}{10 \frac{\text{kg SSV}}{\text{m}^3} \cdot 1.5 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{kg SSV} \cdot d}} = 23.770 \text{ m}^3 \quad (3.176)$$

c. Cálculo del flujo másico y volumétrico de lodo anaerobio que hay que purgar

Aplicando la definición de rendimiento celular basada en flujos másicos:

$$Y = \frac{\text{Flujo másico de } X_{\text{generados}}}{\text{Flujo másico de DQO}_{\text{eliminada}}} \quad (3.177)$$

Se tiene que:

$$\text{Flujo másico de } X_{\text{generados}} = Y \cdot \text{Flujo másico de } DQO_{\text{eliminada}} = Y \cdot Q_0 (S_0 - S_e) \quad (3.178)$$

Calculando el valor:

$$\begin{aligned} \text{Flujo másico de } X_{\text{generados}} &= 0.05 \frac{\text{kg SSV}_{\text{generados}}}{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}} \cdot 2\,000 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \cdot \\ &\cdot 7.428 \frac{\text{kg DQO}_{\text{eliminada}}}{\text{m}^3} = 742.8 \frac{\text{kg SSV}_{\text{generados}}}{\text{h}} \end{aligned} \quad (3.179)$$

Como la corriente de purga tiene una concentración de 15 g SSV/L=15 Kg SSV/m³, entonces:

$$Q_w = \frac{742.8 \frac{\text{kg SSV}_{\text{generados}}}{\text{h}}}{15 \frac{\text{kg SSV}}{\text{m}^3}} = 49.52 \frac{\text{m}^3 \text{ purga}}{\text{h}} \quad (3.180)$$

d. Caudal y tasa de recirculación de fango anaerobio al digestor

Realizamos un balance de microorganismos en el sedimentador (figura 3.17)

$$(Q_0 + Q_R) \cdot X = Q_e \cdot X_e + Q_R \cdot X_R + Q_w \cdot X_w \quad (3.181)$$

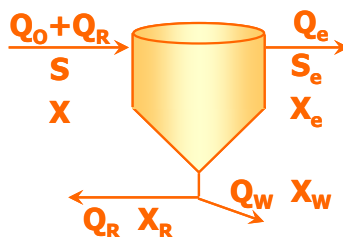


Figura 3.17. Diagrama que muestra el proceso para realizar un balance de microorganismos en el sedimentador.

IMPORTANTE:

X es la concentración de microorganismos en la corriente que viene del digestor.

X_e es despreciable (según el enunciado).

$$X_R = X_W$$

Teniendo en cuenta que la concentración de microorganismos en el efluente es despreciable, el balance se simplifica en la siguiente ecuación, de la que despejamos el caudal de recirculación Q_R:

$$(Q_0 + Q_R) \cdot X = Q_R \cdot X_R + Q_W \cdot X_W \quad (3.182)$$

$$Q_R = \frac{Q_0 \cdot X - Q_W \cdot X_W}{X_R - X} = \frac{2\,000 \frac{m^3}{h} \cdot 10 \frac{kg\ SSV}{m^3} - 49.52 \frac{m^3}{d} \cdot 15 \frac{kg\ SSV}{m^3}}{15 \frac{KgSSV}{m^3} - 10 \frac{KgSSV}{m^3}} = 3\,851.4 \frac{m^3}{h} \quad (3.183)$$

$$Tasa\ de\ recirculación = \frac{Q_R}{Q_0} = \frac{3\,851.4 \frac{m^3}{h}}{2\,000 \frac{m^3}{h}} \approx 1.92 \text{ (adimensional)} \quad (3.184)$$

Problemas 3.11 Sistema de lodos activados para la depuración de agua y producción de biogás

Raúl Muñoz Torre

Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Una industria agroalimentaria genera: $10\,000\text{ m}^3/\text{d}$ de agua residual con 500 mg DQO/L (DQO, Demanda Química de Oxígeno). Para su tratamiento, se ha decidido instalar un sistema de lodos activos que elimine únicamente materia orgánica y opere con una concentración de sólidos suspendidos en el licor mezcla de: 3500 mg SSV/L y una carga másica (F/M) de $0.5\text{ kg DQO}/(\text{kg SSV}\times\text{d})$. En estas condiciones, la concentración de materia orgánica del efluente tratado es de 50 mg DQO/L . El sistema opera con una relación de recirculación $Q_R/Q=0.5$ y una concentración de microorganismos en la corriente de recirculación del sedimentador al tanque aerobio de $10\text{ kg}/\text{m}^3$. Considerando despreciable la cantidad de estos en el efluente clarificado, debido al buen funcionamiento del sedimentador, calcular:

- Volumen del reactor aerobio de eliminación de materia orgánica (m^3).
- Caudales de fango biológico purgado y efluente clarificado (m^3/d).
- Tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiempo de retención celular (TRC), expresados en días.
- Rendimiento celular.
- La concentración de DQO (mg/L) de los microorganismos que hay en el fango biológico purgado, considerando que estos tienen como fórmula química: $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$

El esquema del proceso se representa en el siguiente esquema (figura 3.18):

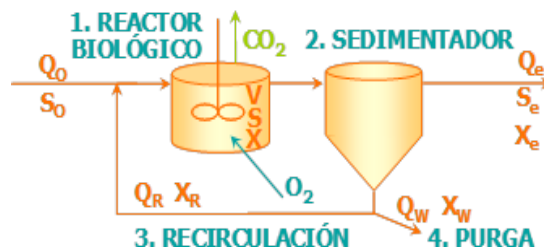


Figura 3.18. Esquema de la instalación de un sistema, para realizar un proceso de tratamiento utilizando lodos activos, para eliminar únicamente materia orgánica.

SOLUCIÓN

Cálculos

a) Volumen del reactor aerobio de eliminación de materia orgánica

Aplicando la definición de carga másica de materia orgánica, podemos despejar el volumen del reactor aerobio:

$$\frac{F}{V} = \frac{\text{kg DQO}_{\text{alimentada}}}{\text{kg SSV}_{\text{reactor}} \cdot d} = \frac{Q \cdot S_0}{X \cdot V} \quad (3.185)$$

Despejando:

$$V_{\text{reactor}} = \frac{Q \cdot S_0}{X \cdot \frac{F}{V}} \quad (3.186)$$

Calculando:

$$V_{\text{reactor}} = \frac{10\,000 \frac{\text{m}^3}{\text{d}} \cdot 500 \frac{\text{g DQO}_{\text{alimentada}}}{\text{m}^3}}{3500 \frac{\text{g SSVLM}}{\text{m}^3_{\text{reactor}}} \cdot 0.5 \frac{\text{kg DQO}_{\text{alimentada}}}{\text{kg SSVLM} \cdot \text{d}}} = 2,857 \text{ m}^3 \quad (3.187)$$

b. Caudales de fango biológico purgado y efluente clarificado

Aplicando un balance de materia a los microorganismos en el sedimentador (figura 3.19):

$$(Q_0 + Q_R) \cdot X = Q_e \cdot X_e + Q_R \cdot X_R + Q_W \cdot X_W \quad (3.188)$$

Donde: $X_e = 0 \text{ mg/L}$

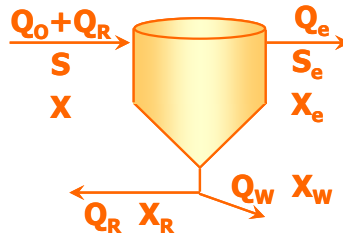


Figura 3.19. Diagrama que muestra el balance de materia en el sedimentador.

$$Q_w = \frac{(Q_0 + Q_R) \cdot X - Q_R \cdot X_R}{X_R} \quad (3.189)$$

Evaluando:

$$Q_w = \frac{\left(10000 \frac{m^3}{d} + 5000 \frac{m^3}{d} \right) \cdot 3.5 \frac{kg}{m^3} - 5000 \frac{m^3}{d} \cdot 10 \frac{kg}{m^3}}{10 \frac{kg}{m^3}} = 250 \frac{m^3}{d} \quad (3.190)$$

Aplicando un balance de materia a la fase global de todo el sistema obtenemos:

$$Q_e = Q - Q_w = 10\,000 - 250 = 9\,750 \frac{m^3}{d} \quad (3.191)$$

c. Tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiempo de retención celular (TRC)

Aplicando la definición de tiempo de retención hidráulico y celular se obtienen:

$$TRH = \frac{V}{Q_0} = \frac{2\,857.1 \, m^3}{10\,000 \frac{m^3}{d}} = 0.2857 \, d \quad (3.192)$$

$$TRC = \frac{V \cdot X}{P_x} = \frac{2\,857.1 \, m^3 \cdot 3.5 \frac{kg}{m^3}}{2\,500 \frac{kg}{d}} = 4 \, d \quad (3.193)$$

La producción de fangos de un sistema biológico se puede estimar como:

$$P_x = Q_w \cdot X_w + Q_e \cdot X_e \quad (3.194)$$

Donde es despreciable debido al buen funcionamiento del sedimentador.

$$P_x = Q_w \cdot X_w = 250 \frac{m^3}{d} \cdot 10 \frac{kg}{m^3} = 2\,500 \frac{kg\ SSV}{d} \quad (3.195)$$

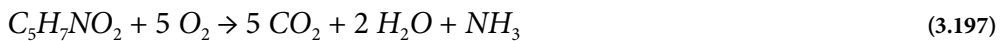
d. Rendimiento celular

$$Y = \frac{P_x}{Q_0(S_0 - S)} = \frac{2\,500 \frac{kg}{d}}{10\,000 \frac{m^3}{d} \cdot \left(0.5 \frac{kg\ DQO}{m^3} - 0.05 \frac{kg\ DQO}{m^3}\right)} = 0.555 \frac{kg\ X}{kg\ SQO} \quad (3.196)$$

Aplicando la definición de flujo másico de producción de fangos, en función del rendimiento celular y del flujo másico de DQO consumida.

e. La concentración de DQO de los microorganismos que hay en el fango biológico de purga

Podemos estimar la concentración de DQO presente en los microorganismos de acuerdo a la siguiente ecuación:



Donde 5 moles de oxígeno molecular son necesarias para oxidar 1 mol de biomasa

$$\frac{(5)(32)}{113} = 1.42 \frac{g\ O_2}{g\ C_5H_7NO_2} \quad (3.198)$$

De esta forma, teniendo en cuenta que la concentración de microorganismos en la corriente de purga es de 10 000 mg SSV /L, la cantidad de DQO de estos en la corriente sería= 10000 mg SSV/L·1.42 mg O₂/mg SSV=14200 mg O₂/L.

Problemas 3.12 Diseño de un fotobiorreactor de lagunaje de alta carga (HRAP, High rate algal pond, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de agua residual.

Raúl Muñoz Torre

Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Marco teórico

- Diseño basado en acoplar la demanda biológica de oxígeno (DBO) del agua residual a la capacidad de oxigenación del HRAP como consecuencia del crecimiento fotosintético de las microalgas.
- Protocolo de diseño basado en 30 años de experiencia en HRAPs a escala industrial en California.
- Microalgas y bacterias trabajando en simbiosis.
- 1 kg de algas produce 1.5 kg de O₂
- Diseño basado en limitación por suministro de luz
- Ni el Nitrógeno ni el Fósforo limitan el proceso

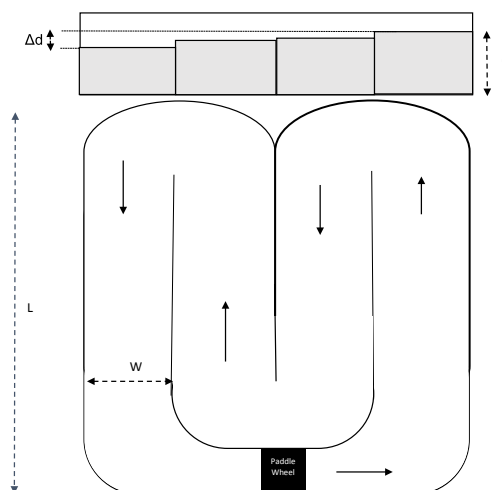


Figura 3.20. Diagrama de HRAP

Definiciones previas

- Canales de profundidad d (ft)
- Canales de anchura W (ft)
- Longitud del canal L (ft)
- Velocidad de recirculación V (ft/s)

Radio hidráulico: Área sobre el que ocurre la fricción del líquido recirculado por perímetro de HRAP

$$R = \frac{\text{Área}}{\text{Perímetro}} = \frac{d \cdot W}{W + 2 \cdot d} \quad (3.199)$$

Pérdida de carga por fricción en el HRAP (expresada como $\Delta d/L$) debido a la fricción del agua recirculante con la superficie del HRAP,

$$\frac{\Delta d}{L} = \frac{V^2}{\left(1.486/n\right)^2} \cdot R^{1.33} \quad (3.200)$$

Donde n es el factor de fricción de Manning, tabla 3.13 (Adimensional).

Tabla 3.13. Factores de Manning para diferentes materiales de construcción de la superficie del HRAP.

Material de superficie del HRAP	Factor de Fricción de Manning
Plástico o cemento liso	0.008
Tierra lisa o plástico corrugado	0.01
Plástico liso en tierra granular	0.012
Cemento Portland liso	0.013
Asfalto liso	0.015
Asfalto prensado	0.016
Tierra lisa compostada	0.020
Grava prensado o asfalto	0.025
Tierra sin prensar	0.030

- La penetración de la Luz se determina a partir de experiencias con disco Secchi.

$$d_p (cm) = \frac{6\ 000}{[Biomasa]} \quad (3.201)$$

Donde: $[Biomasa] (mg / L) = [DBO_{última}]$

- Experimentalmente se ha visto que la concentración de biomasa en HRAPs limitados por luz corresponde a aquella que permite penetrar a la luz 2/3 de la profundidad del HRAP.

$$d_p (cm) = \frac{9\ 000}{[Biomasa]} \quad (3.202)$$

- Área del HRAP se define como $N W L (ft^2)$, donde N es el número de canales
 - Cada cambio en la dirección del caldo de cultivo supone una pérdida de carga definida como:

$$\Delta d (ft) = \frac{V^2}{2 g} \quad (3.203)$$

- La determinación del tiempo de retención mínimo (θ) para la eliminación de DBO puede hacerse con:

$$\theta = \frac{[DBO] \cdot d \cdot h}{85.93 \cdot F \cdot S} \quad (3.204)$$

donde:

$[DBO]$ = Concentración de DBO a eliminar (mg/L^{-1})

d = Profundidad del HRAP (cm)

h = Calor específico de las microalgas (cal/mg^{-1}); típicamente 5.5

F = Eficiencia fotosintética (%); típicamente 0.025

S = Irradiación media ($W h m^{-2} d^{-1}$)

- La producción de oxígeno derivado del crecimiento algal ($g m^{-2}d^{-1}$) puede determinarse con:

$$P = \frac{0.015 \cdot d}{\vartheta} \cdot C_0 \quad (3.205)$$

donde:

d , profundidad del HRAP (cm)

θ , tiempo de residencia (d)

C_0 , concentración de microalgas (mg L^{-1})

Protocolo de diseño

- i. Determinar la carga de DBO a tratar
 - Si el HRAP va precedido de una laguna facultativa la carga es 50% de la entrada.
 - Si el HRAP va precedido de un tratamiento anaerobio la carga es del 60%.
 - Si el HRAP va precedido de un tratamiento primario la carga es del 70%.
- ii. Estimar la concentración de biomasa (C_0) en función de la DBO de entrada al HRAP.
- iii. Estimar la profundidad del HRAP (d) para soportar una penetración de la luz de 2/3.
- iv. Estimar el tiempo de residencia del agua residual mínimo (θ) para eliminar el porcentaje de DBO deseado.
- v. Estimar la producción de oxígeno (P) en el HRAP ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$).
- vi. Calcular el área necesaria del sistema para satisfacer la demanda de O_2 como la carga de DBO a eliminar dividido entre el potencial de producción de oxígeno P .
- vii. Estimar las dimensiones del espacio donde encajaría, $\text{Área} = L \cdot W \cdot N^0$; asumiendo un $L/W = 40:1$. Se calculará N^0 hasta para que la pérdida de carga del sistema cumpla que: (fricción + cambios de dirección) < 3 pulgadas (donde 3 pulgadas equivale a 0.25 pies).

$$0.25 = N^0 \cdot L \cdot \frac{V^2}{\left(\frac{1.486}{n}\right)^2} \cdot R^{1.33} + N^0 \cdot \frac{V^2}{2 \text{ g}} \quad (3.206)$$

Enunciado del problema

Diseñar un fotobiorreactor de lagunaje de alta carga (HRAP)(figura 3.21) para el tratamiento de agua residual urbana con una concentración de materia orgánica de $350 \text{ mg DBO L}^{-1}$, que proviene de una población de 10000 habitantes.

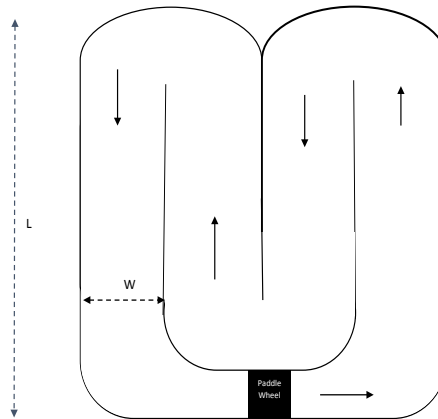


Figura 3.21. Ilustración de la configuración de fotobiorreactor de lagunaje de alta carga usado para el tratamiento de aguas residuales.

El fotobiorreactor se instalará en las inmediaciones de la Ciudad de México (ver datos de irradiación media mensual en la 3.14) y su diseño se basará en un recubrimiento plástico de baja resistencia al flujo y una velocidad de recirculación del líquido de 20 cm s^{-1} . La eficiencia de la eliminación de materia orgánica biodegradable requerida es del 99%, asumiendo que el HRAP va precedido de un tratamiento primario convencional por sedimentación.

Tabla 3.14. Valores medios de irradiación en ciudad de México expresado en $\text{kW h/m}^2/\text{d}$ (Fuente UNAM/NASA).

Irradiación/ Meses	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Min	Max	Med
Mínimo	3.1	3.3	3.1	3.8	4.1	4.4	4.5	4.5	4.1	3.5	3.1	2.8	2.8	4.5	3.7
Máximo	5.4	6.3	6.6	7.5	8.3	8.6	7	6.6	6.7	6.0	5.7	5.6	5.4	8.6	6.7
Promedio	4.1	4.7	5.3	5.7	5.9	5.6	5.6	5.5	5.1	4.7	4.3	3.8	3.8	5.9	5.0

Determinar:

1. Las dimensiones del HRAP (Área, profundidad, longitud, anchura, n° de Canales)
2. Tiempo de residencia del agua (θ) residual mínimo para el tratamiento del agua residual (días)
3. Capacidad de oxigenación del HRAP ($\text{g/m}^2/\text{días}^{-1}$) y el área necesaria para cubrir la demanda de O_2
4. Estimar las dimensiones del espacio donde ubicaría el sistema $\text{Área} = L \cdot W \cdot N^0$; asumiendo un $L/W = 40:1$. Se calculará N^0 para que la pérdida de carga del sistema cumpla que: (fricción + cambios de dirección) < 3 pulgadas (donde 3 pulgadas equivale a 0.25 pies)

Datos para diseño

Eficiencia fotosintética: 2.5%

Calor específico de microalgas: 5.5 cal mg^{-1}

Generación diaria de agua residual por habitante en Ciudad de México = $210 \text{ L habitante}^{-1}\text{d}^{-1}$

Tabla 3.15. Equivalencias de unidades

1 pulgada	254	m
1 libra	0.4536	kg
1 pie	0.3048	m

Solución

a) *Determinar las dimensiones del HRAP (Área, profundidad, longitud, anchura, n° de Canales)*

a.1) Determinar la carga de DBO a tratar

- Si el HRAP va precedido de una laguna facultativa la carga es 50% de la entrada
- Si el HRAP va precedido de un tratamiento anaerobio la carga es del 60%
- Si el HRAP va precedido de un tratamiento primario la carga es del 70%

La carga inicial de entrada al sistema (sedimentador primario + HRAP) será de:

$$Q \cdot [\text{DBO}] = (\text{N}^\circ \text{ de habitantes}) \cdot (\text{Agua residual generada por habitante}) \cdot [\text{DBO}] = \\
 (10000 \text{ habitantes}) (210 \text{ L habitante}^{-1}) (350 \text{ mg DBO L}^{-1}) = 735\,000\,000 \text{ mg día}^{-1} = 735 \text{ kg día}^{-1}$$

Tras su paso por el sedimentador primario (Tratamiento Primario) se eliminará el 30% de esta carga, por lo que la carga diaria de DBO que entrará al HRAP es de (735 kg/día⁻¹) (0.7) = 514 kg d⁻¹, y la concentración de DBO en el agua residual será de 245 mg L⁻¹ asumiendo que no se dan pérdidas de agua por evaporación.

a.2) Estimar la concentración de biomasa (Co) en función de la DBO de entrada al HRAP

Según el protocolo de diseño: $C_0 = [\text{DBO}]_{\text{entrada}} \cdot (0.99) = 243 \text{ mg Biomasa} / \text{L}$

a.3) Estimar la profundidad del HRAP (d) para soportar una penetración de la luz de 2/3

$$d_p = \frac{9\,000}{[\text{Biomasa}]} = \frac{9\,000}{243 \text{ mg Biomasa} / \text{L}} = 37 \text{ cm}$$

b) Determinar el tiempo de residencia del agua residual mínimo (θ) para el tratamiento del agua residual

b.1) Estimar el tiempo de residencia del agua residual mínimo (q) para eliminar el porcentaje de DBO deseado.

La cantidad de DBO a eliminar será (245 mg/L⁻¹) (0.99) = 242.5 mg L⁻¹. Se diseña para el valor mínimo promedio de irradiación para realizar un diseño conservador.

$$\theta = \frac{[\text{DBO}] \cdot d \cdot h}{85.93 \cdot F \cdot S} = \frac{(242.5)(37)(5.5)}{(85.93)(0.025)(3800)} = 6 \text{ días}$$

c) Determinar la capacidad de oxigenación del HRAP ($\text{g}/\text{m}^2/\text{d}^1$) y el área necesaria cubrir la demanda de O_2

c.1) Estimar la producción de oxígeno (P) en el HRAP ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$)

$$P = \frac{0.015 \cdot d}{\theta} \cdot C_0 = \frac{(0.015)(37)}{6} \cdot 243 = 22.4 \text{ g} / \text{m}^2 / \text{d}^{-1}$$

c.2) Calcular el área necesaria del sistema para satisfacer la demanda de O_2 como la carga de DBO a eliminar dividido entre el potencial de producción de oxígeno.

$$\begin{aligned} \text{Area} &= (\text{carga de DBO a eliminar})(\text{Producción de oxígeno})^{-1} \\ &= (514\,000 \text{ g DBO} / \text{día})(0.99)(22.4 \text{ g} / \text{m}^2 / \text{día})^{-1} \\ &= 22\,878 \text{ m}^2 \\ &= 2.9 \text{ ha} \end{aligned}$$

d) Estimar las dimensiones del espacio donde encajaría Área = $L W N^0$; asumiendo un $L/W = 40:1$. Se calculará N^0 la pérdida de carga del sistema (fricción + cambios de dirección) < 3 pulgadas (donde 3 pulgadas equivale a 0.25 pies)

$$22\,878 \text{ m}^2 = (0.3048 \cdot L)^2 / 40 \cdot N^0 \text{ canales}$$

Con la limitante de que $\Delta d < 0.25 \text{ ft}$, sustituyendo valores en la ecuación (3.206) se tiene la ecuación siguiente,

$$0.25 = N^0 \cdot L \cdot \frac{(0.66 \text{ ft} / \text{s})^2}{\left(\frac{1.486}{0.008}\right)^2} \cdot \left(\frac{\left(\frac{0.367}{0.3048} \cdot \frac{L}{40} \right)^{1.33}}{\frac{L}{40} + 2(0.367 / 0.3048)} \right) + N^0 \cdot \frac{(0.66 \text{ ft} / \text{s})^2}{2(64.4)} \quad (3.207)$$

La ecuación (3.206) se puede resolver numéricamente y se obtienen los valores: $N^0 = 19$ y $L = 720 \text{ ft} = 219 \text{ m}$

Problema 3.13 Estimación de costos del uso de una planta piloto de bioprocesos

Rodolfo Quintero Ramírez

Introducción

Un centro público de investigación en México, cuenta con una planta piloto de bioprocesos que consiste en: dos fermentadores (1 000 L y 100 L), una centrifuga tubular, una centrifuga de disco, un molino de perlas agitadas, un ultrafiltro, una columna de cromatografía de filtración en gel, una columna de cromatografía de intercambio iónico, y tres tanques agitados para precipitación y preparación de mezcla. Sus servicios son cobrados con base en el tiempo que dura la operación en cada equipo, \$3 000/hora y el usuario proporciona: las materias primas, los reactivos químicos que se utilicen y paga los análisis que se requieran.

Las características del equipo de la planta piloto (figura 3.22) son las siguientes:

- Fermentador de 1 000 L (volumen nominal). $H/D=3$. Tres agitadores Rushton, $D/D_i=1/3$, motor de 2 HP, un compresor de aire que maneja un flujo de $1.5 \text{ m}^3/\text{min}$.
- Fermentador de 100 L (volumen nominal). $H/D=3$, tres agitadores Rushton, $D/D_i=1/3$, motor de 0.25 HP, un compresor de aire que maneja un flujo de $0.2 \text{ m}^3/\text{min}$.
- Centrifuga tubular: 0.4 a $38 \text{ L}/\text{min}^{-1}$ (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 121) tamaño de partícula 0.1 a 200 micras, diámetro 10 cm, altura 100 cm, velocidad máxima $15\,000$ RPM (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, 121), contenido de sólido máximo 0.5% , produce una torta firme, operación intermitente.
- Centrifuga de disco y boquilla: 40 - $150 \text{ L}/\text{min}^{-1}$ (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 124) diámetro 254 mm velocidad máxima $10\,000$ RPM, tamaño de partícula 0.5 a 200 micras, contenido de sólidos 2 a 20 , produce un lodo firme, operación continua, θ es de 42° , radio 18 cm y número de discos 100 .
- Molino de perlas agitadas: 4L , flujo de $50 \text{ L}/\text{h}^{-1}$ (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 168).

- Ultrafiltro: flujo volumétrico de $30 \text{ L/m}^2 \text{ h}^{-1}$ (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 463) y la membrana tiene una superficie de 100 m^2 (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 463). 0.5 g/L^{-1} a 10 g/L^{-1} .
- Columna de cromatografía: flujo de 1.5 L/min^{-1} , 20 cm de largo y un diámetro interno de 5 cm, la columna produce 3.2 g/ciclo y el ciclo toma 6 horas. Si usted quiere procesar 10 L/h^{-1} (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011, p. 372).

Problema

Un industrial quiere que le produzcan 1 kilogramo de una enzima intracelular que sintetiza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y desea que se le haga una cotización por ese servicio.

La información sobre la producción de la enzima intracelular está contenida en una patente, que tiene la siguiente información técnica:

- La enzima está constituida por 346 aminoácidos y se conoce toda la secuencia nucleótida.
- Es estable en el rango de temperaturas de $10 - 50 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH de $5 - 9$.
- La levadura la produce la enzima en todas las fases de la fermentación, alcanzando a ser el 2% del total de la proteína.
- El método de laboratorio que ya han desarrollado consiste en: producir la levadura en 40 horas, un paso de ruptura celular por sonicación, la centrifugación del cultivo sonificado y la recuperación del producto en una columna níquel agarosa. Después se eluye la columna y la solución resultante es el producto.

Solución

Ahora el problema que tiene el responsable de la planta piloto, un ingeniero biólogo, es decidir qué equipo va a utilizar para poder llevar a cabo el proceso de producción para obtener un kilogramo de producto.

En fermentaciones de planta piloto la concentración celular que se alcanza está entre 10 y 30 g/L^{-1} , de acuerdo a las especificaciones del equipo que existe en los dos fermentadores se escoge la de 30 g , porque este tiene una alta capacidad de transferencia de oxígeno ($P/V=2 \text{ w/L}$, 2 VVM para el fermentador de 1000 l) y ($P/V=2.5 \text{ w/l}$, 2.7 VVM para el fermentador de 100 l).

Con este dato calcula: ¿Cuánto producto podría obtener por fermentación?

- Fermentador de 1 000 litros (volumen nominal):

Volumen de operación= 750 litros

$$(750) \left(30 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \left(0.5 \frac{\text{g proteína}}{\text{g célula}} \right) \left(0.2 \frac{\text{g enzima}}{\text{g proteína}} \right) = 225 \frac{\text{g enzima}}{\text{batch}}$$

- Fermentador de 100 litros (volumen nominal)

Volumen de operación= 75 litros

$$(75) \left(30 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \left(0.5 \frac{\text{g proteína}}{\text{g célula}} \right) \left(0.2 \frac{\text{g enzima}}{\text{g proteína}} \right) = 22.5 \frac{\text{g enzima}}{\text{batch}}$$

Con estos resultados, se decide utilizar el fermentador de 1 000 L ya que con cinco fermentaciones puede obtener el producto solicitado.

La estimación de la cantidad de producto por cada lote será revisada más adelante, una vez que se decida cuáles son las etapas del bioproceso y se considere el rendimiento que se obtiene en cada una de ellas.

Una vez que se ha escogido el fermentador de 1 000 L, entonces se diseña el bioproceso para la obtención del producto.

De acuerdo a la literatura (Harrison, Todd et al, 2015) los rendimientos típicos que se obtienen en cada una de las etapas seleccionadas son (tabla 3.16):

Tabla 3.16. Rendimiento típicos que se obtienen por etapa.

Equipo	Rendimiento
Centrifuga de disco	99%
Ruptura celular (Molino de perlas agitadas)	90%
Centrifuga tubular	99%
Precipitación con sulfato de amonio	75%
Ultrafiltración	90%
Cromatografía de intercambio iónico	80%
Cromatografía de filtración en gel	75%

Proceso de producción

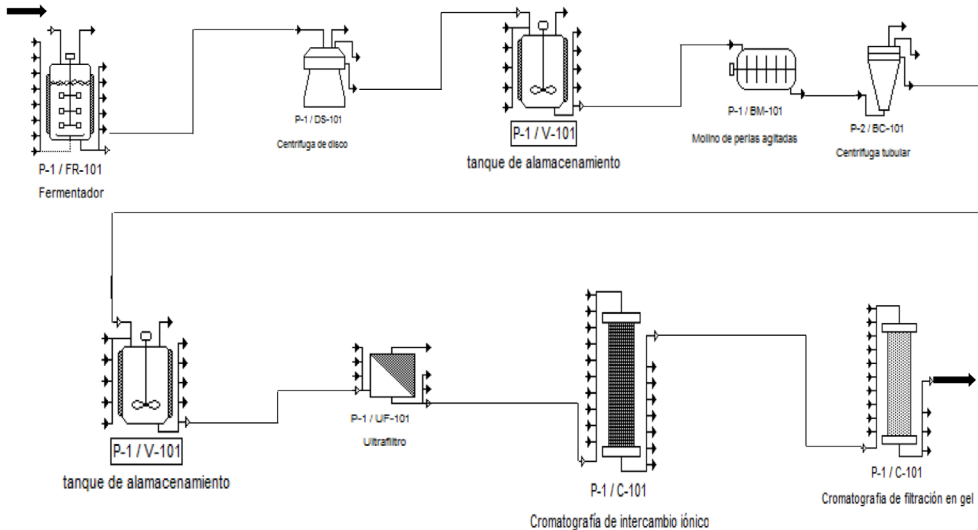


Figura 3.22. Diagrama de flujo del proceso de producción de una enzima intracelular.

Calcular el tiempo que tomara cada operación para así poder hacer la estimación de costos y plantearle una cotización al industrial.

Características de levadura: 5 a 10 micras, densidad de 1 050 a 1 090 kg/m^3 , radio de 2.5 micras, velocidad de sedimentación de 0.5 cm/ hora y el número de Reynolds es de 7×10^{-6} . Densidad de *Saccharomyces cerevisiae* 1.11 g/m^3 .

Solución

La primera actividad es: diseñar un bioproceso en la planta piloto que se tiene. Se utilizan criterios basados en la experiencia para el desarrollo de este, de acuerdo a la literatura (Harrison, Todd et al, 2015) los criterios que se siguen se muestran a continuación:

- La separación de insolubles, mediante la remoción de células, también reduce el volumen; operación típica la centrifugación.
- Aislamiento del producto, se reduce el volumen y si es intracelular se rompe la célula, generalmente se eliminan materiales con propiedades muy diferentes a las del producto; operación típica: homogeneización (molino de perlas agitadas) y la precipitación (con sulfato de amonio).

- Purificación del producto, se remueven las impurezas que por lo general ya son muy parecidas al producto deseado; operación típica: diferentes tipos de cromatografía y precipitación fraccionada.
- Acabado de producto, generalmente hay remoción de líquidos, la enzima se puede cristalizar, no siempre es posible hacerlo y en ocasiones el producto se presenta como una solución; operación típica: secado y cristalización.

Con estos criterios se diseñó el proceso tomando en cuenta el equipo disponible en la planta piloto.

El segundo paso consiste en: estimar los rendimientos que tendrá cada una de las operaciones.

Fermentador: La concentración típica de levadura en procesos aeróbicos a nivel piloto es entre 20 y 30 g/L⁻¹, en este caso el motor de agitación es de 5 HP es decir 3 728.5 watts, y como el volumen de operación es el 75% del nominal entonces son 1 500 L o 1.5 m³. Por lo tanto, la potencia máxima/ volumen es de 2.49 w/L⁻¹, este es un valor que asegura un alto coeficiente de transferencia de masa (Quintero Ramírez, 1981); y el flujo máximo de aire puede ser de 2 VVM, este valor también asegura que hay una alta transferencia de oxígeno. En virtud de lo anterior vamos a suponer que se alcanza una concentración de biomasa de 30 g/L⁻¹.

De acuerdo a la información del proceso desarrollado a nivel laboratorio, el producto es el 2% del total de la proteína y la levadura tiene 50% de esta biomolécula en peso seco; de tal manera que en 30 g/L⁻¹, es decir que la concentración del producto en el fermentador es de 0.3 g/L⁻¹. El tiempo fermentación es de 30 horas, pero a esto hay que agregar que al preparar el fermentador de 2 000 L y esterilizarlo se requieren al menos 4 horas, entonces el costo por uso del fermentador para un lote es de \$102 000.

Los rendimientos típicos de las operaciones unitarias de separación que se usan en la planta piloto son (tabla 3.17):

Con estos valores podemos calcular el rendimiento por batch.

El volumen inicial de operación es de 1 500 L con una concentración de 0.3 g/L⁻¹ del producto o sea 450 g, tomando en cuenta esta masa, calculamos los gramos/batch en cada etapa.

Tabla 3.17. Cálculos para el rendimiento en las diferentes etapas del proceso.

Etapas	Rendimiento (%)	Gramos/batch (g)
Centrifuga de disco	99	445.5
Ruptura celular (Molino de perlas agitadas)	100	445.5
Centrifuga tubular	99	441.05
Precipitación con sulfato de amonio	75	396.9
Ultrafiltración	90	297.7
Cromatografía de intercambio iónico	80	238.16
Cromatografía de filtración en gel	75	178.62

Problema 3.14 Proceso para generar una innovación tecnológica con fines de comercialización

Nohra Elsy Beltrán Vargas

Introducción

La ingeniería busca el uso de la ciencia y las matemáticas para realizar aplicaciones prácticas que sean útiles para las personas. Como ingenieros podemos convertir nuevo conocimiento en algo útil que pueda llegar a comercializarse.

Por otra parte, la tecnología es el resultado final de la aplicación práctica del conocimiento en un área en particular. En este caso, como ingeniera biomédica, les explicaré el proceso para identificar si una nueva idea de desarrollo tecnológico puede llegar a patentarse con fines de comercialización a partir de un ejemplo de una aplicación médica.

En el caso del área médica, como ingenieros buscamos diseñar y construir nuevas tecnologías para el diagnóstico, tratamiento y estudio de las enfermedades humanas.

Para iniciar el proceso de generación de una innovación, se debe identificar una necesidad o problema a resolver a partir del cual se realizará una evaluación de las soluciones actuales en el mercado, se identificarán los posibles usuarios y se hará una prueba de concepto a partir de una idea que se crea puede solucionar algún problema en particular.

El diseño de productos para aplicaciones médicas requiere de un proceso ordenado, documentado y con seguimiento de cada paso que se tiene en su desarrollo, ya que se necesitan de varias pruebas en modelos animales y humanos, además de certificaciones para que se puedan comercializar. De acuerdo a la metodología propuesta por varios autores, en la figura 3.23 se presenta un esquema que resume los pasos a seguir para tener un producto validado (fase 1), que posteriormente se pueda escalar con fines de comercialización (fase 2).

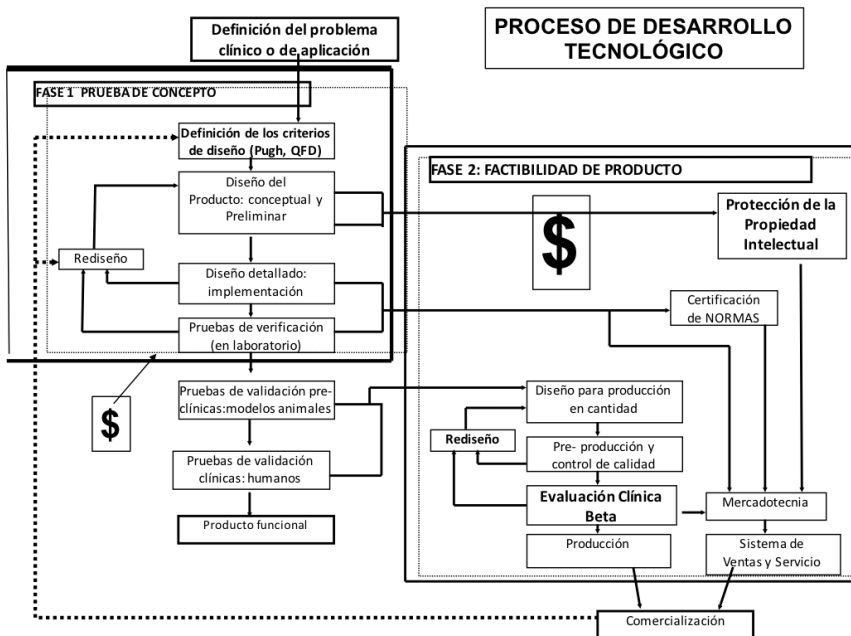


Figura 3.23. Metodología a seguir para el diseño de un nuevo desarrollo tecnológico.

El surgimiento de una idea o una necesidad permite la definición de los objetivos a seguir en la generación de un nuevo producto. Esto marca el inicio para el desarrollo de la prueba de conceptos, los cuales serán evaluados por medio de una matriz de Pugh para elegir el más adecuado y viable.

La matriz de Pugh es una herramienta que se utiliza para la toma de decisiones sobre el desarrollo de un nuevo producto o servicio, diferenciando los criterios importantes para priorizar las características del artículo que se va a desarrollar o comercializar. Siempre es bueno realizar un estudio comparativo de las diferentes alternativas que se tienen buscando el mayor beneficio con el producto que se quiera desarrollar.

Posteriormente se realiza un análisis más detallado de lo que se quiere lograr, a través de la matriz de Despliegue de Función de Calidad (o Quality Function Deployment, QFD por sus siglas en inglés), en donde se describen de manera detallada las necesidades del usuario del producto y se definen las características prioritarias a cumplir de este último.

Luego, se pasa a la etapa de diseño del producto, la cual involucra 3 fases que se describen a continuación (figura 3.24).

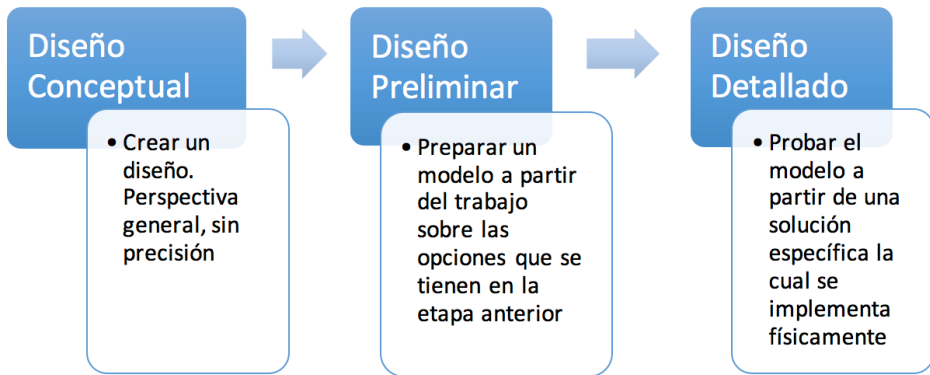


Figura 3.24. Etapas de diseño de nuevos productos.

El peso o importancia de los requerimientos es establecido a través de la matriz de despliegue de función de calidad QFD, mencionada anteriormente. Ya que se eligió un concepto, es importante realizar un análisis del mercado y la viabilidad financiera de nuestra idea a través de la elaboración de un plan de negocios. La complejidad y limitaciones para el diseño de un dispositivo médico, requiere ser abordado por medio de módulos para simplificar este. Una vez establecido el diseño conceptual, preliminar y detallado, se procede a su implementación física para comprobar su correcto funcionamiento. Las pruebas de verificación y validación son unas de las etapas finales en el diseño de dispositivos médicos, y tienen la finalidad de comprobar su correcto, deseado y esperado funcionamiento. Por último, es importante mencionar el impacto del factor humano en todo el proceso de desarrollo de estos artículos, con el objeto de facilitar su uso y prevenir errores en su funcionamiento.

Problema

Se tiene una idea para desarrollar un nuevo producto a base de celulosa bacteriana que puede ser utilizado como material de curación para personas quemadas, además, se desea saber si realmente es innovador, y si podría comercializarse. ¿Qué haría para demostrar la factibilidad del producto de acuerdo a lo explicado anteriormente?

Usaremos la siguiente metodología para explicar el proceso que permite evaluar la factibilidad del producto: partiendo de la búsqueda de información publicada en el área de interés, estudio del posible mercado o usuarios de la tecnología propuesta, y luego se explicará el proceso para evaluar si puede protegerse industrialmente mediante una patente, para comercializar el producto generado.

Es decir:

- i. Búsqueda de antecedentes.
- ii. Estudio de mercado.
- iii. Estudio de patentabilidad.

1. *Antecedentes clínicos*

El cuerpo humano cuenta con varios mecanismos de defensa para su protección; entre los cuales se encuentra la piel, que actúa como barrera de superficie entre el cuerpo humano y el ambiente, brindando protección frente a agentes físicos, químicos y biológicos, además de favorecer el intercambio de temperatura con el medio ambiente (Arenas Gómez, Merizalde Soto et al, 2012). De acuerdo a la World Health Organization (WHO, por sus siglas en inglés), las quemaduras representan un grave problema de salud a nivel mundial, registrando 265 mil muertes al año siendo así la decimoquinta causa de muerte en niños y jóvenes adultos.

Han surgido diferentes alternativas de tratamiento de pacientes quemados, como el uso de injertos de piel que consiste en el trasplante de epidermis y una porción mayor o menor de dermis (total o parcial). En general los injertos proporcionan una solución a la regeneración de células epiteliales; sin embargo, el injerto requiere de un buen aporte sanguíneo para evitar necrosis (Suárez Alonso & Palomar Llatas, 2012). Además pueden presentar desventajas como son: infecciones, cicatrices atróficas, cambios de color de la piel, y superficie de piel desigual (Mackay & Miraliakbari, 2006).

Una alternativa que desplaza el uso de injertos son los sustitutos cutáneos que tienen como finalidad suministrar un soporte mecánico para la migración y proliferación celular. Se clasifican en: a) sustitutos epidérmicos, que utilizan queratinocitos autólogos cultivados, pero presentan desventajas como fragilidad mecánica y limitaciones de aplicación en zonas profundas; b) sustitutos dérmicos, que consisten en una matriz de colágeno porcino, o bovino, pero son temporales y c) sustitutos dermo-epidérmicos, que usan células alogénicas de piel incorporadas a un soporte dérmico, estas son cubiertas bioactivas temporales por lo que su tiempo de vida es corto. Por otra parte, el uso de biomateriales como matrices de colágeno y fibrina, parecen ser una buena opción para la proliferación celular epitelial; sin embargo, a pesar de que estos sustitutos mejoran la función de la piel como barrera protectora no restauran otras funciones tales como: sensación táctil, temperatura, excreción, respiración, termorregulación, protección contra rayos ultravioleta, sintéticas y estéticas (Arenas Gómez, Merizalde Soto et al, 2012). Es por ello, que el uso de biomateriales se puede considerar una excelente alternativa para desarrollar matrices que cumplan con las características necesarias para la proliferación de células epiteliales, que sean biocompatibles y que proporcionen buenos resultados estéticos.

Recientemente se ha propuesto el uso de celulosa bacteriana como matriz de soporte celular epitelial (Bottan, Robotti et al, 2014). En la actualidad existen empresas que comercializan: vasos sanguíneos artificiales (BASYC®), andamios para ingeniería de tejidos (XCell®), productos para cuidados de heridas (NANODERM™), a base de celulosa bacteriana. Debido a que esta posee alta resistencia mecánica, así como capacidad para absorber líquidos, es biocompatible y altamente cristalino, la hacen ideal para desarrollar materiales en el área biomédica. Tales como: hidrogeles súper-absorbentes, materiales de curación para el tratamiento de heridas y quemaduras, regeneración de hueso, implantes cardiovasculares y neuronales, cornea artificial, conductos urinarios e implantes dentales o bien para la liberación de fármacos (Goh, Rosma et al, 2012; Rajwade, Paknikar et al, 2015).

De acuerdo a la información obtenida, queda claro que es importante generar nuevas opciones de tratamiento para pacientes quemados, y que la celulosa bacteriana ha sido empleada para esta aplicación, en particular, debido a varias propiedades favorables para las aplicaciones médicas.

2. Estudio de mercado

Ahora se analizará el número de personas quemadas, para saber si hay un gran impacto desde el punto de vista comercial, en generar productos en esta área. También se estudiará la competencia directa de productos similares en el mercado, pues hay que conocer qué existe y cuánto cuesta, para que se pueda comparar con el producto propuesto y así definir si se tiene algo diferente e innovador en algún sentido.

De acuerdo a la American Burn Association (ABA, por sus siglas en inglés), en promedio se presentan entre 20 000 y 25 000 quemados al año en Estados Unidos (American Burn Association, 2015).

En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, reportó que durante el año 2013 se presentaron 126 786 nuevos casos de quemaduras y en enero del 2014 se registraron 65 182 casos. Este problema de salud genera consecuencias como discapacidad, daño psicológico y económico; puesto que la atención pre-hospitalaria y hospitalaria para los quemados representa altos costos. Se ha estimado que los costos por paciente varían entre \$30 000 y \$500 000 pesos en casos de severidad leve sin disfunción orgánica; de \$500,000 a \$5 000, 000 de pesos en casos de severidad moderada (con o sin disfunción orgánica); y de 5 a 40 millones de pesos en casos severos (con o sin falla orgánica múltiple) (World Health Organization, 2015; Moctezuma-Paz, Páez-Franco et al, 2015).

Al realizar la búsqueda de empresas con productos comerciales similares al propuesto, se encontró información de apósitos en el mercado para el tratamiento de quemaduras, que están hechos con materiales como: colágeno de bovino (en la gran mayoría de los productos), polímeros como alginato, espumas de poliuretano hidrófilo, materiales compuestos, entre otros. Hay pocos productos comerciales que contienen celulosa bacteriana como son: Nanoderm®, Dermafillm® y DURAFIBER®; los cuales provienen de otros países. Estas empresas son la competencia directa, pero en México no hay empresas que ofrezcan apósitos del material propuesto, lo que sugiere que habría una posibilidad de explotación comercial.

3. Estudio de patentabilidad

Analizar las patentes que existen en un país relacionadas a una cierta tecnología que se desea comercializar, permite identificar los competidores directos, indirectos y potenciales para un negocio en particular. Para este ejemplo, se buscó en la base de datos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) sin encontrar productos relacionados con el apósito propuesto.

Sin embargo, internacionalmente sí se encontraron patentes relacionadas, como en el caso del: “Apósito utilizable como cobertura temporal para el tratamiento de heridas”, WO 2009068713 A1. Pero no utiliza celulosa bacteriana.

Otro ejemplo es la patente: “Composición tópica en forma de gel para el tratamiento de quemaduras de la piel”, WO 2004089406 A1; que describe un producto para aplicación en quemados, pero con un concepto diferente al producto que se está evaluando.

Aun cuando existen despachos especializados en realizar el trabajo de búsqueda de patentes, es importante que quien desarrolla una nueva idea con fines comerciales, realice una primera búsqueda para identificar productos similares a la invención en cuestión en el país en donde se quiere comercializar éste. Aquí sólo se mencionaron dos ejemplos, pero es importante que se realice una búsqueda detallada de invenciones similares y se identifique si la posible “innovación” realmente existe para que se pueda proteger.

Problema 3.15 Estrategia para dar valor agregado a residuos de cítricos en una empresa

Maribel Hernández Guerrero

1. Introducción

Este problema presenta un caso de estudio real, que fue solucionado a través de una consultoría hecha por la UAM-C, en conjunto con el Dr. Rodolfo Quintero Ramírez y el alumno de ingeniería biológica Daniel Camacho Ibarra.

De acuerdo a la United Nations Educational, Scientific & Cultural Organization (UNESCO, por sus siglas en inglés), el ingeniero es un “motor de la innovación y del desarrollo social y económico” de un país. Una de las áreas en la que un ingeniero puede incursionar es la consultoría la cual consiste en la prestación de servicios independientes para la identificación y/o solución de problemas a través de planteamiento de ideas, diseño de estrategias, procedimientos o métodos, investigación, implementación, elaboración de recomendaciones, planteamiento de proyectos, entre otras actividades de carácter profesional. Como trabajo, la consultoría es multidisciplinaria ya que el ingeniero comparte su experiencia y conocimiento con profesionales de otras áreas para llegar a plantear una solución a las necesidades del cliente. Datos de la UNESCO indican que la consultoría privada, es una industria de alta importancia con ingresos de hasta \$490 billones USD a nivel mundial (Wall, 2010). Como un área nueva, la consultoría en México va tomando mucha importancia; existen ya incluso órganos reguladores de dicha actividad profesional como lo son la Cámara Nacional de Empresas de Consultoría (CNEC). Los procedimientos de gestión de la calidad y la integridad de la consultoría son a su vez regulados por la Federación Internacional de Ingenieros Consultores (FIDIC). Los consultores también pueden lograr certificaciones basadas en lineamientos de conducta y códigos de ética (CNEC, 2009).

La consultoría como parte del aprendizaje en el aula es todavía un esquema poco adoptado, sin embargo, puede ser de gran utilidad para el desarrollo del alumno y del emprendimiento (Elstein, 2011). A través del caso de estudio presentado en este problema, se da un acercamiento del alumno a situaciones reales desde el aula, en esta ocasión, una consultoría generando aprendizaje significativo y aplicado a proyectos (Waks, 1997;

Mooney-Frank, 2000). Se pretende desarrollar en el alumno habilidades como el trabajo colaborativo, la investigación, comprensión de un tema, y formulación de una propuesta sencilla. También se ejercita la comunicación escrita y el profesor tiene la opción de solicitar una comunicación oral. El problema está diseñado para alumnos de licenciaturas afines con biología, ingeniería y biotecnología. En específico para la Licenciatura en Ingeniería Biológica, el problema puede presentarse a los alumnos del noveno trimestre en la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) de seminario de ingeniería en alimentos o para alguna optativa de Temas Selectos en Ingeniería Biológica de los trimestres siete a doce.

2. Planteamiento del problema

Una empresa dedicada a la producción de jugos de cítricos situada en una zona residencial de la ciudad de México (con un área de 60 m²) genera alrededor de una tonelada/día de residuos cítricos. Los residuos constan de: cáscaras de cítricos (80% cáscara de naranja y 20% de cáscara de limón y toronja mezcladas). Estos residuos se generan después de la extracción de los jugos a través de cuchillas y un descorazonador. El productor solicita información acerca de posibles usos de los **residuos de naranja** para proponer desarrollos para generar productos de valor agregado.

3. Desarrollo de la solución

Para introducir a los alumnos al tema de la consultoría se presentan las recomendaciones para elaborar propuestas de servicios de este tipo presentado por la Cámara Nacional de Empresas de Consultoría (CNEC México) (CNEC, 2009) y los siguientes lineamientos generales para guiarlos a una conclusión; sin embargo, el planteamiento de la solución puede ser libremente sugerida por el alumno.

3.1. Levantamiento de información de la empresa y recomendaciones.

En un estudio real, el levantamiento de la información tendría que hacerse *insitu* sin embargo, por facilidad los datos se proporcionan al alumno para conocer mejor la situación de la empresa.

Área de la empresa: 60 m², ubicación: Zona residencial de la Ciudad de México.

Capacidad de planta: 1 tonelada/día de residuos cítricos.

Tipo de residuo: 80% cáscara de naranja, 20% cáscara de limón y toronja. Bagazo y semillas (triturado). El desecho a tratar es exclusivamente el de naranja.

Ramo industrial: Industria de bebidas y jugos.

Residuos a tratar: naranja (80% de la capacidad de planta).

Servicios: Luz, agua.

Distribución de planta: áreas de recepción de materias primas (cítricos), concentrados de jugos y conservadores, lavado y desinfección, extracción de jugo, envasado, sanitización, almacén, área administrativa y residuos. La planta está dividida en dos secciones principales sin separación por muros. En la primera sección se encuentran el área de recepción, lavado y desinfección. En este mismo espacio está el área de producción (extracción) y envasado, la zona de almacenamiento temporal de concentrados de jugos y conservadores, una tarja de sanitización de manos para los empleados y el área de residuos. La segunda sección está al fondo de las instalaciones y a un nivel de 40 cm más alta que la primera sección, consiste en las áreas administrativas que comparten espacio con la superficie del almacén de producto e insumos, además de recipientes para envasado.

Equipo: Dos extractores de jugos, tarja de lavado, lavadora Kärcher.

Mercado: Varios restaurantes de la ciudad.

Número de trabajadores: cuatro (dos en área de recepción, lavado y producción; 2 en área administrativa)

El alumno consultor presentará recomendaciones generales a la empresa de acuerdo a su diseño y distribución de planta indicando el orden o arreglo físico más óptimo para todas las instalaciones incluyendo: áreas de trabajo, zonas de equipo, servicios y almacenes en los espacios físicos de la empresa. Con el objetivo de minimizar tiempos y movimientos, incrementar la productividad, así como reducir riesgos y accidentes siguiendo una secuencia lógica de producción. El alumno debe tomar en cuenta que las áreas de una empresa pueden incluir: recepción, almacén, líneas de producción, embalaje, despacho, transporte previo a la distribución, áreas administrativas, laboratorios (cuando la empresa genera investigación y desarrollo), áreas de seguridad (incluyen instalaciones de sanitización en empresas de alimentos y farmacéuticas) y finalmente en algunas empresas, áreas verdes y de comida y esparcimiento. El análisis de la distribución se hace con base en la experiencia del consultor y como alternativa se pueden utilizar softwares tan sencillos como Power Point, Autocad o más especializados como ConceptDraw Pro (Engineering Area).

Después del análisis de las áreas y equipos, se concluye que el espacio es adecuado para la producción actual de la planta; sin embargo, se recomienda tener una zona fuera de las instalaciones para residuos. Las áreas de recepción de materias primas (cítricos), lavado, sanitización, extracción de jugo y envasado tienen buena distribución. Se recomienda tener la tarja de sanitización a la entrada de las instalaciones para asegurar los controles de calidad. Además, se aconseja una división clara entre el área administrativa y el almacén.

3.2. *Colecta de información bibliográfica*

Con base en la consulta bibliográfica científica, técnica y comercial en revistas científicas y bases de datos de patentes se obtuvieron datos de la materia prima y se identificaron diferentes productos que se han obtenido en México y el mundo a partir de residuos de cítricos como se muestra a continuación.

3.2.1. Composición de los cítricos

Los cítricos están constituidos por tres partes principales (figura 3.25 izquierda): exocarpo (o flavedo, de donde se pueden extraer aceites esenciales y flavonoides), un mesocarpo (o albedo; capa blanca esponjosa en el interior de la cáscara y rica en pectina) y el endocarpo (gajos, pulpa con tricomas- glándulas con jugo). Los principales componentes de la naranja son: agua, flavonoides, aceites esenciales, lignina y polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa (éstos tres últimos denominados lignocelulósicos) y pectina (figura 3.25 derecha) (Pinzón-Bedoya & Cardona Tamayo, 2008). La cantidad de flavonoides, aceites esenciales y polisacáridos dependen de la madurez y la zona de procedencia del fruto. Las características y usos principales de cada uno de estos componentes se pueden ver resumidos en la tabla 3.18.

Los **flavonoides** son compuestos fenólicos con una alta capacidad antioxidante. Se encuentran principalmente en la piel de los frutos aportando color y sabor a estos. Tienen aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Se utilizan como suplementos dietéticos y aditivos de alimentos, antioxidantes, pigmentos para alimentos y bebidas, como saborizantes y edulcorantes, agentes antisolares (absorben rayos UV), antidescongestionantes, agentes de tratamiento de piel sensible y antienvjecimiento y como agentes de fortalecimiento de capilares sanguíneos (Ochoa & Ayala, 2011).

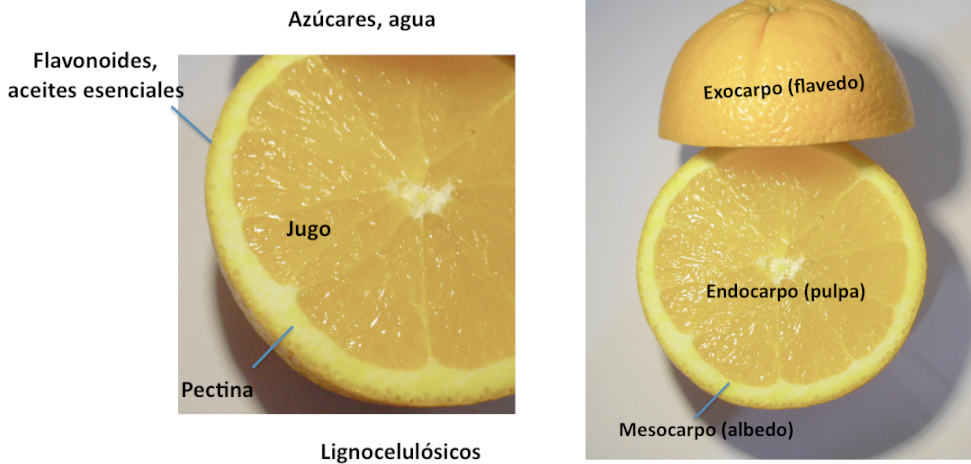


Figura 3.25. Composición de los cítricos de estudio.

Los **aceites esenciales** son sustancias líquidas destilables que dan el aroma de las plantas y los frutos. Se utilizan principalmente para la industria cosmética en perfumes y aromatizantes, en la industria de alimentos como condimentos y saborizantes, así como en la farmacéutica como saborizantes (Cerutti & Neumayer, 2004).

Por otra parte, la **lignina** es uno de los materiales orgánicos de origen natural más abundantes en el planeta. Es un polímero ramificado encontrado en las paredes celulares de las plantas y frutos. Algunos de sus usos incluyen emulsificantes, como aditivo para alimento animal, como supresor de polvos en carreteras, como precursor de químicos como el dimetilsulfóxido y la vainillina, para tratamiento de aguas contaminadas, la producción de energía a través de su combustión entre otras (Cruz, Dopico et al, 1997; El Mansouri, 2007).

La **celulosa** es el polímero principal que compone la pared celular de las plantas superiores y algas y puede ser producida por hongos y bacterias. Entre sus principales usos se encuentran: la fabricación de fibras textiles, elaboración de papel, como emulsificante en la industria de alimentos, en pastas de pintado o en adhesivos especiales, así como en la industria farmacéutica como vehículo para fármacos (Keshk, 2014; NETZSCH, 2016).

La **hemicelulosa** es otro polímero formado por varios polisacáridos (xilanos, mananos, b-glucanos y xiloglucanos) (Peng & She, 2014). En conjunto con la lignina la hemicelulosa le da estructura a las plantas y cáscara de frutos. Se utiliza en la producción de etanol o el xilitol por fermentación.

La **pectina** es un polisacárido ácido de origen natural que se encuentra principalmente en las manzanas, membrillos y naranjas. Entre algunos de sus usos se encuentra la elaboración de mermeladas, jaleas o confituras, gelatinas y salsas, principalmente por sus características para producir geles (Alpuche-Salazar, 2001), también como agente espesante, emulsificante y estabilizante (Pectina, 2016).

Finalmente, de la pulpa de la naranja se extraen también otras moléculas denominadas **carotenoides** que se utilizan principalmente como colorantes para la industria alimenticia, cosmética o bien para la farmacéutica (Noviendri, Hasrini et al, 2011).

3.2.2. Composición de los residuos de naranja

En la naranja, un 48% es jugo (usado para comercialización) mientras que el otro 52% es considerado un residuo y está constituido por la cáscara, el albedo, los tricomas y semillas. En base a un análisis químico proximal (que mide el contenido de humedad, grasa, proteína y cenizas) la naranja, después de exprimirse está constituida principalmente por agua (78%), mientras que el contenido de fibra y proteína son del 13.37% y 4.45% respectivamente, cenizas, nitrógeno amoniacal y orgánico constituyen otro 4.3%. La tabla 3.19 muestra los resultados de composición de la naranja después de la extracción de jugo (Bustamante, Galindo et al, 2003). Alrededor de 35.4-36.9% de la fibra total en el bagazo seco de la naranja, es fibra dietética. Esta fibra es principalmente rica en: pectinas (15.7 a 16.3%), celulosa y hemicelulosa (16.6 a 18.1%) y lignina (7.3 a 10.3%) (tabla 3.20) (Grigelmo-Miguel & Martín-Beloso, 1998). Por otro estudio de análisis proximal llevado a cabo en la Universidad de Cartagena (tabla 3.21), se sabe que la cáscara de naranja contiene en su mayoría agua (65%) y alrededor de 3% de fibra y 1.6% de proteína (Tejada Mansir, Montesinos Cisneros et al, 2011). Los licores del prensado de cáscara de naranja son de interés para la obtención de compuestos funcionales. Los licores son obtenidos dentro del proceso de producción de alimentos para ganado (figura 3.26). La cáscara se trata con cal viva y se prensa de manera previa a la peletización.

Tabla 3.18. Usos de los principales componentes de los cítricos.

Componente	Industria	Usos
Flavonoides	Alimenticia	Suplementos dietéticos, aditivos de alimentos, pigmentos para alimentos y bebidas, saborizantes, edulcorantes, agentes antisolares
	Cosmética	
	Farmacéutica	
Aceites esenciales	Alimenticia	Perfumes, aromatizantes, condimento y saborizante
	Cosmética	
	Farmacéutica	
Lignina	Alimenticia	Emulsificante, aditivo para alimento animal, supresor de polvo en carreteras, tratamiento de aguas, combustible
	Transporte	
	Energéticos	
Celulosa	Textil	Fibras textiles, papel, emulsificante, en pinturas, adhesivos, vehículo para fármacos
	Papelera	
	Alimenticia	
	Pinturas	
	Farmacéutica	
Hemicelulosa	Agrícola	Acelerador de crecimiento en plantas, alimento para animales y peces, afecciones gastrointestinales
	Alimenticia	
	Farmacéutica	
Pectina	Alimenticia	Mermeladas, jaleas, gelatinas, salsas, emulsificante, espesante, estabilizante

Durante el prensado se recuperan los licores provenientes de la cáscara. Después de un proceso de centrifugación estos licores son separados en tres distintas fases. La fase menos densa (capa coloidal color amarillo verdoso) corresponde del 1 al 5% en volumen y contiene principalmente *d* y *d,l*-limoneno.

Tabla 3.19. Análisis químico proximal de naranja después de extracción de jugo.

Componente	%	Componente	%	Componente	%
Humedad	78	Nitrógeno amoniacal	0.104	Fibra total	13.37
Ceniza	3.485	Nitrógeno orgánico	0.713	Proteína total	4.45

La capa media (amarillo pálido o bien café pálido, donde el color más claro corresponde a un pH menor) es acuosa y contiene azúcares disueltos, hemicelulosas estabilizadas y pec-

tin. La tercera fase es sólida y consiste en fragmentos pequeños de cáscara. La cantidad recuperada varía entre lotes, pero es aproximadamente de 5-10 g/100 mL.

Tabla 3.20. Composición de la fibra dietética en bagazo de la naranja.

Componente	%	Componente	%
Pectinas	15.7-16.3	Hemicelulosa	7.3-10.3
Celulosa	16.6-18.1	Lignina	2.2-3.0

Tabla 3.21. Análisis químico proximal de cáscara de naranja.

Componente	%	Componente	%	Componente	%
Humedad	65	Grasa Cuda	4	Cenizas	1.6
Proteína	1.65	Fibra	3.26		

3.3. Aplicaciones comerciales de residuos cítricos en el mundo

Actualmente, existen productos comerciales basados en residuos de cítricos que incluyen aditivos de fibra para la industria de alimentos (Citrafiber™) y limpiadores (Citrus based cleaner Ltd.) de uso general, con base en los extractos (aceites) de cítricos. Por otra parte, ya existe una planta (Citrotecno) de tratamiento de residuos cítricos única en el mundo en Valencia España, en donde se producen: alimento para animales, bioetanol y aceites esenciales a partir de residuos de naranja. En esta planta de tratamiento también se recupera agua, la cual es utilizada para el riego de cultivos de esta fruta. A continuación, se presenta un resumen de los productos comerciales basados en residuos cítricos, tabla 3.22.

Tabla 3.22. Resumen de productos comerciales de residuos cítricos.

Producto	Origen	Descripción	Aplicaciones
Citrafiber™	Florida USA	Fibra de residuos cítricos	Bebidas: aditivo nutricional
			Alimentos: horneado, aditivo de carnes, curado de jamón, sustituto de huevo, barras energéticas, sopas, panquecitos, vinagretas, queso, tortillas
			Veterinaria: arenilla para gatos, comida de animales, sustituto de aserrín en camas de animales
			Nutracéutico: beneficios antioxidantes, fibra, bioflavonoides
			Industria: remoción de metales de aguas residuales, adsorbente de aceites
Limpiador	Nueva Zelanda	Extractos (aceites)	Removedor de grasa, aceites y mugre
Pellet	España	Pulpa de cítrico	Alimentación animal
Bioetanol	España	Biocombustible	Combustible para mezcla con gasolinas convencionales (hasta en un 15% en autos convencionales y 85% en autos modificados).
d-limoneno	España	Aceite esencial	Alimentos y farmacéutica (saborizante y aromatizante)
			Disolvente de resinas y pinturas. Insecticida.



Figura 3.26. Proceso de obtención de licores de prensado de cáscara de cítricos durante la producción de alimento para ganado.

Citrafiber™ de Natural Citrus Products Corporation (Citrafiber™ 2010) es un producto registrado de fibra de residuos cítricos (con dos patentes y una patente pendiente). Sus usos van desde la industria de bebidas como aditivo nutricional; en la de alimentos para el horneado, como aditivo de carnes, curado de jamón, sustituto de huevo, barras energéticas, sopas, panquecitos, vinagretas, queso, tortillas; veterinaria: arenilla para gatos, comida de animales, sustituto de aserrín en camas de animales; como nutracéutico por sus beneficios antioxidantes, de fibra y bioflavonoides; y hasta su uso industrial: en la remoción de metales de aguas residuales y como adsorbente de aceites.

El limpiador de uso general de Citrus based cleaner Ltd. (Citrus based cleaner, 2016) : remueve grasa, aceites, olores en manos y mugre en general, de manera efectiva sin dañar superficies y está compuesto de extractos de naranja (aceites) con tensoactivos biodegradables, agentes para suspender polvos, ablandadores de agua, agentes secuestrantes (mejoradores).

Una de las aplicaciones más interesantes e integrales se ha desarrollado en la planta de Citrotecno. En España se generan 6.5 millones de toneladas de cítricos al año (65% provenientes de Valencia). Esto corresponde a cuatro millones de toneladas anuales de cítricos en Valencia; de los cuales el 60% es para consumo fresco, 30% son ya utilizados en otras industrias y el 10% son considerados residuos. En el año de 2008 se gestionó el proyecto de €20 millones para establecer una planta tratadora de estos residuos. En dicha planta, desde los últimos meses del año 2010 (cuando fue establecida) se tratan de 120 000 a 150 000 toneladas/año de las 400 000 toneladas de residuos cítricos contaminantes generados en Valencia anualmente. La empresa Citrotecno trata los residuos cítricos (figura 4) para la obtención de productos tales como pellets de alimento para animales (19 000 t), el bioetanol (4 800 000 L) y aceite esencial *d*-limoneno (275 000 kg).

Los residuos son tratados con cal y prensados para obtener dos fracciones; una líquida y una sólida (figura 3.28). La fracción sólida se deshidrata para obtener el alimento para animales en forma de pellet. Mientras que la fracción líquida pasa por un proceso de desaceitado para la obtención de azúcares que son fermentados y destilados para la producción de bioetanol. Como subproductos de estos procesos, se obtienen 68 000 000 L de agua (de la deshidratación de los residuos) para riego y red potable y el aceite esencial *d*-limoneno (en el proceso de desaceitado de la fracción sólida).

Pellets para alimentación de ganado, bioetanol, *d*-limoneno. El pellet consiste en pulpa de cítrico deshidratada (pelletizada) de hemicelulosa 6%, fibra bruta 15.9%, fibra neutro detergente 24.6% y proteínas 7.6%. Se utiliza en la elaboración de productos para alimentación animal por su aporte nutricional para el ganado.

Bioetanol. Es considerado un biocombustible de segunda generación (es decir, en su producción no se emplean alimentos de manera directa). Es un combustible limpio y reno-

vale que puede mezclarse con gasolinas convencionales hasta en 15% para automóviles estándar o en un 85% para vehículos modificados (Benítez, Tovar et al, 2010).

d-limoneno. Es un aceite esencial de amplio uso en la industria alimentaria y farmacéutica como saborizante y aromatizante. Se puede utilizar en la fabricación de dulces y bebidas; como disolvente de resinas, pinturas y tintas; como insecticida doméstico y para jardinería, ya que no tiene efectos tóxicos para mascotas y humanos (Albaladejo 1999, Agócs, Nagy et al, 2007).

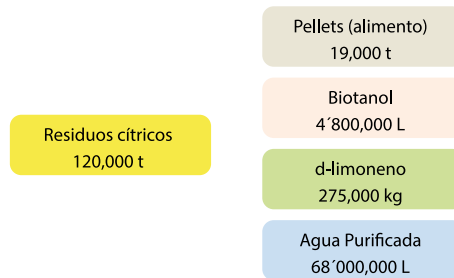


Figura 3.27. Capacidad de la planta de tratamiento de residuos cítricos Citrotecno.

Agua. Debido a la alta humedad de los residuos se hace factible la recuperación de agua. Sin embargo, el proceso de la deshidratación resulta muy caro: son necesarios entre 250 a 300 litros de combustible y 200 kw/h de electricidad para producir una tonelada de subproducto deshidratado.

3.4. Desarrollos del uso de residuos cítricos en México

En México son varios los expertos de instituciones privadas, universidades y dependencias de gobierno que han trabajado en el manejo y procesamiento de desechos frutícolas. A continuación, se presenta una breve descripción de los estudios en México.

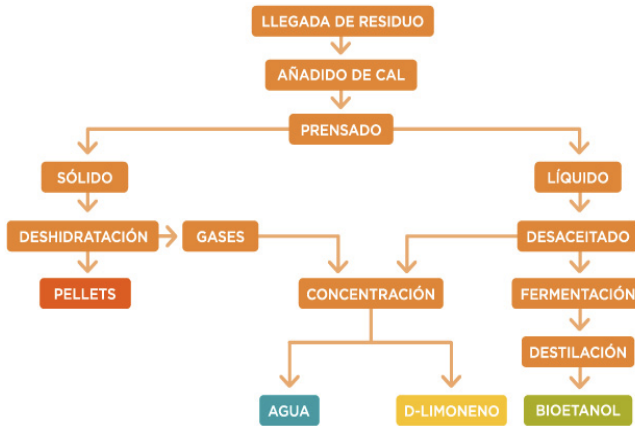


Figura 3.28. Proceso de tratamiento de residuos cítricos (Citrotecno).

Residuos como medio de cultivo. Se utilizan para producción de proteína unicelular mostrando un incremento de 20% en el rendimiento convencional de la proteína (Cornejo Montenegro, 1984).

También son medio de cultivo para bacterias o enzimas fúngicas para la producción de algún ácido orgánico de interés nutracéutico (G.C., J. et al, 1984).

Desarrollos enfocados a alimentos. Para la obtención de cereales con alto contenido en fibra usando los residuos de naranja (Priego, 2007).

Fibra dietética. Entre las fuentes más importantes de fibra de bajo costo se encuentran los residuos de la industria de los jugos. Como se mencionó anteriormente, el residuo derivado de la extracción de jugo de naranja es cerca del 50%.

Nutraceuticos. Los antioxidantes de los residuos son un ejemplo y se estudian para estabilizar aceites y bases de aderezos (Nutracéuticos, 2012).

Bioproteína. Se obtiene a partir de un tratamiento biológico a los residuos con microorganismos para producir o incrementar ciertas proteínas en estos. El producto obtenido funciona como complemento en la alimentación de aves, cerdos y otros animales.

Estudios enfocados a actividades agrícolas, composteo. Los residuos pueden ser tratados para fines agrícolas o para rellenos sanitarios o tiraderos controlados. El composteo manual o pasivo (rendimiento del 40%) no necesita de un desarrollo tecnológico alto ni una gran inversión económica (Sauri Riancho, Nájera Aguilar et al, 2002).

Obtención de polímeros (bioplásticos). Se han realizado estudios para poder obtener empaques biodegradables basados en residuos cítricos por su alto contenido de celulosa y lignina (Arévalo, Alemán et al, 2010). El CINVESTAV realiza estudios para obtener monómeros (unidades fundamentales de los polímeros o bioplásticos) (Gómez-Patiño, B. et al, 2012).

Melazas. Se pueden obtener de la cáscara de cítricos mediante concentración y se utilizan para alimentación o una vez fermentadas para obtener biogás (Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, 1998).

Fuente de fenoles y flavonoides para desinfectantes. Los flavonoides se encuentran en la pulpa de la fruta y se utilizan como edulcorantes en la industria alimentaria y farmacéutica (Yepes, Montoya et al, 2008). Se han obtenido polifenoles y flavonoides para elaborar productos desinfectantes y así poder eliminar las bacterias en vegetales.

4. Número de referencias y patentes relacionadas

A continuación, se presenta información relacionada con el número de referencias y patentes encontradas en la base de datos ISI Web of Knowledge.

Tabla 3.23. Resumen de referencias y patentes

Palabras de búsqueda	Patentes	Artículos (ISI)
Orange residues applications	0	4
Orange bagasse uses	0	7
Lemon residues uses	3	5
Grapefruits residues uses	1	14
Grapefruits residues applications	0	1

5. Propuesta

Con base en la consulta bibliográfica y a las condiciones de la empresa, la cual no puede expandirse en instalaciones, se proponen las siguientes aplicaciones para los residuos cítricos producidos en Daprona, México.

1. Componente de harinas y aditivos para la industria alimenticia.
2. Material adsorbente y deodorizante.
3. Iniciador de fuego.

Las metodologías seguidas para estos productos son sencillas y factibles de acuerdo a las condiciones e infraestructura de Daprona México. Para la primera y segunda aplicación, mencionada anteriormente, el residuo requeriría de secado y molido. El secado podría subcontratarse en empresas de la ciudad. Para la tercera aplicación propuesta no se requeriría de un molido, sino más bien de una compresión. La primera aplicación propuesta se considera la de mayor interés ya que se encuentra dentro del mismo ramo de la industria (alimentos) por lo que no se tendrían que hacer grandes cambios en la logística de la empresa. Este residuo contiene grandes cantidades de fibra por lo que se ha propuesto su utilización para la elaboración de harinas como base para distintos productos. Las cantidades de harina que se utilizan en la industria de panificación varían de acuerdo al tipo de producto requerido. Por ejemplo, para la elaboración de snacks se puede utilizar una formulación con 33.3% en peso de polvo de naranja, 33.3% de miel, 16.6% de maní tostado y molido y 16.6% de pasas molidas (Sáenz, Estévez et al, 2007).

V

- Abarca, C., Martinez, A., Caro, M. and Quintero, R. (1992). Optimización del proceso de fermentación para producción *Bacillus thuringiensis* Var. Aisawai. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 2 (3), pp. 51-56.
- Agócs, A., Nagy, V., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R. and Deli, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative food science & emerging technologies*, 8 (3), pp. 390-394.
- Albaladejo, Q. (1999). *El Aceite Esencial de limón producido en España. Contribución a su evaluación por Organismos Internacionales*. Recuperado de: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/121/1/Albaladejo.pdf>
- Alpuche-Salazar, R. (2001). *Elaboración de complejos polielectrólitos a partir de quitosana y su aplicación en tecnología ambiental*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- American Burn Association. (2015). National Burn Repository®.
- Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. (1998). La naranja Mexicana en voz de sus actores. *Revista Claridades Agropecuarias*, 63 pp. 3-20.
- Arenas, C., Merizalde, G. and Restrepo, L. (2012). Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos. *IATREIA*, 25 (1), pp. 5-11.
- Arévalo, K., Alemán, M., Rojas, M. and Morales, R. (2010). Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología y Ambiente Algal*, 1 (2), pp. 124-134.
- Badger, W. and Banchemo, J. (1981). *Introducción a la ingeniería química*. Pensilvania, EE. UU.: McGraw Hill.
- Benítez, L., et al. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, N.10 pp. 120-125.
- Bottan, S. et al. (2015). Surface-Structural Bacterial Cellulose with Guided Assembly-Based Biolithography (GAB). *ACS nano* 9. pp. 206-219.

- Bravo, A. and Quintero, R. (1993). Importancia y potencial del *Bacillus thuringiensis* en el control de plagas. *Revista de la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe*. N.10. Santiago, Chile, pp. 1-55.
- Bustamante, Z., Galindo, E., Huanca, M. and Ballesteros, F. (2010) Obtención de bioproteína a partir de desechos agroindustriales. Bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus Níger*. Programa *Fármacos, Alimentos y Cosméticos*. (PROFAC), Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón. Bolivia. Recuperado de: <http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/downloads/49.pdf>.
- Cerutti, M. & Neumayer, F. (2004). "Introducción a la obtención de aceite esencial de limón." *Invenio* 7(12). pp. 149-155. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/877/87701214.pdf>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy conversion and management*, 51(7), pp. 1412-1421.
- Citrafiber™. (2010). Página web. Recuperado de: <http://www.naturalcitrusproducts.com/about-us/>.
- Citrus based cleaner. (2016). Página web. Recuperado de: <http://www.citrusbasedcleaner.co.nz/specials.html>.
- CNEC, (2009). Recomendaciones para elaborar propuestas de servicios de consultoría, Cámara Nacional de Empresas de Consultoría.
- Cornejo Montenegro, M. X. (1984). "Utilización de cáscara de naranja para producción de proteína unicelular."
- Cruz, R., Dopico, D., Figueredo, J., Rodríguez, M. & Martínez, G. (1997). Uso de la Lignina de Bagazo con fines medicinales. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 14(1), pp. 67-71.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Liden, G. (2003). *Bioreaction Engineering Principles*. New York, E.U.A: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Díaz Fernández, M. (2012). *Ingeniería de bioprocesos*. Madrid, España: Paraninfo.
- Doran, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza, España: Acribia S.A., 468 pp.

- El Mansouri, N.-E. (2007). Despolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas, Universitat Rovira i Virgili.
- Elstein, D. (2011). Reflexión Académica. */i/Diseño y Comunicación, 22/i/*, pp. 58-61.
- Felder, R. & Rousseau, R.(2006). */i/ Principios elementales de los procesos químicos. /i/* Ciudad de México, México: LIMUSA.
- Figuroa, A. (2011). */i/ Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un Biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. /i/* (Tesis de Doctorado), Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- Figuroa, A., Esparza, T., Saucedo, G., Huerta, S., Gutierrez, M. & Favela, E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. */i/ Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 86/i/(10)*, pp. 1321-1331.
- Fitz Patrick, M., Champagne, P., Cunningham, M. F. and Whitney, R. A. (2010). "A bio-refinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products." *Bioresour Technol 101(23): 8915-8922.*
- G. C., O., C. E. J., R. H. R. and Aguilar, N. A. (1984). *Tratamiento de residuos por fermentación fúngica en medio sólido.* Revista Acta Química Mexicana 1(2): 1-13.
- Goh, W., A. Rosma, B. Kaur, A. Fazilah, A. Karim & R. Bhat (2012). *Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration & fermentation time on the yield of microbial cellulose.* International Food Research Journal 19(1).
- Gómez-Patiño, M. B., M. B. & A. D. (2012). *Componentes Estructurales Bioplásticos de la Cáscara de dos Cítricos.*
- Grigelmo-Miguel, N. & O. Martín-Belloso (1998). *Characterization of dietary fiber from orange juice extraction.* Food research international 31(5): 355-361.
- Harrison, R. G., P. Todd, S. R. Rudge & D. P. Petrides (2015). *Bioseparations science & engineering, Topics in Chemical Engineering.*
- Himmelblau, D. M. & J. L. R. Huerta (1988). *Balances de materia y energía,* Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Kern, D. Q. D. Q. K. (2008). *Procesos de transferencia de calor.*

- Keshk, S. M. (2014). *Bacterial cellulose production & its industrial applications*. Journal of Bioprocessing & Biotechniques 4(2): 1.
- Khanahmadi, M., R. Roostaazad, A. Safekordi, R. Bozorgmehri & D. A. Mitchell (2004). *Investigating the use of cooling surfaces in solid-state fermentation tray bioreactors: modelling & experimentation*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 79(11): pp. 1228-1242.
- Kirk, O., T. V. Borchert & C. C. Fuglsang (2002). *Industrial enzyme applications*. Current opinion in biotechnology 13(4): 345-351.
- Mackay, D. R. & R. Miraliakbari (2006). *Skin grafts. Operative Techniques in General Surgery*. 8(4).
- McCabe, W. L., J. C. Smith & P. Harriott (1993). *Unit operations of chemical engineering*, New York, E.U.A, M.
- Minjares-Carranco, A., B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar & G. Viniegra-González (1997). *Physiological comparison between pectinase-producing mutants of Aspergillus niger adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation*. Enzyme & Microbial Technology 21(1): 25-31.
- Mitchell, D., B. Lonsane, A. Durand, R. Renaud, S. Almanza, J. Maratray, C. Desgranges, P. Crooke, K. Hong & R. Tanner (1992). *General principles of reactor design & operation for SSC*. Solid Substrate Cultivation: 115-139.
- Mitchell, D. A., O. F. von Meien & N. Krieger (2003). *Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat & mass transfer in bioreactors*. Biochemical Engineering Journal 13(2-3): 137-147.
- Moctezuma-Paz, L. E., I. Páez-Franco, S. Jiménez-González, K. D. Miguel-Jaimes, G. Foncerrada-Ortega, A. Y. Sánchez-Flores, N. A. González-Contreras, N. X. Albores-de la Riva & V. Nuñez-Luna (2015). *Epidemiología de las quemaduras en México*. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas 20(1).
- Mooney-Frank, J. A. (2000). *William Heard Kilpatrick: Progressive educator, curriculum innovator, & social philosopher. The impact of his Project Method on today's innovations*.
- Najafpour, G. D. (2007). *Biochemical engineering & biotechnology*. Amsterdam.

- National Institute of Standards & Technology. Recuperado de: 18 de agosto 2017, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C75092&Mask=FFFF&Units=SI>.
- NETZSCH. (2016). *Derivados de celulosa*. Recuperado de: 19 de agosto de 2017, <https://www.netzsch-grinding.com/es/chemical-industry/celulosa-pasta/derivados-de-celulosa/>
- N. M. Recuperado de: 17 de octubre 2017, http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4872700&fecha=03/04/1998.
- Noviendri, D., R. F. Hasrini & F. Octavianti (2011). *Carotenoids: Sources, medicinal properties & their application in food & nutraceutical industry*. Journal of Medicinal Plants Research 5(33): pp. 7119-7131.
- Nutracéuticos (2012) *Obtienen universitarios nutracéuticos a partir de residuos agroindustriales*. Boletín UNAM-DGCS-233.
- Ochoa, C. I. & A. A. Ayala (2011). *Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos*.
- Ochoa-Villarreal, M., S. Howat, S. Hong, M. O. Jang, Y. W. Jin, E. K. Lee & G. J. Loake (2016). *Plant cell culture strategies for the production of natural products*. BMB Rep 49(3): pp. 149-158.
- Ooijkaas, L. P., F. J. Weber, R. M. Buitelaar, J. Tramper & A. Rinzema (2000). *Defined media & inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems*. Trends Biotechnol 18(8): pp. 356-360.
- Organización internacional del café, I. (2015). *Informe del mercado del café*. Recuperado de: 17 de octubre 2017, <http://www.ico.org/documents/cy2014-15/cmr-0315-c.pdf>.
- Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal 13(2): pp. 81-84.
- Pandey, A., P. Selvakumar, C. R. Soccol & P. Nigam (1999). *Solid state fermentation for the production of industrial enzymes*. Current science: pp. 149-162.
- Pectina. (2016). *Aditivos alimentarios: Uso de la Pectina 440*. Recuperado de: 19 de agosto de 2017, <http://www.aditivosalimentarios.com/index.php/codigo/440i/pectina/>.
- Peng, P. & D. She (2014). *Isolation, structural characterization, & potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review*. Carbohydrate polymers 112: pp. 701-720.

- Pinzón-Bedoya, M. L. & A. M. Cardona Tamayo (2008). *Caracterización de la cáscara de naranja para su uso como material bioadsorbente*. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 6(1).
- Priego, M. (2007). *Obtención de Fibra Dietética a Partir de Sáculos de naranja aplicando un Tratamiento con vapor*. (Tesis de Licenciatura) Universidad Autónoma de la Mixteca. Huajuapán de León. México.
- Prior, A. B., J. C. DuPreez & P. W. Rein (1992). *Environmental parameters. Solid substrate cultivation*. H. W. Doelle, D. A. Mitchell & C. E. Rolz. London, England: Elsevier Applied Science.
- Quianzon, C. C. & I. Cheikh (2012). *History of insulin*. J Community Hosp Intern Med Perspect 2(2).
- Quintero Ramírez, R. (1981). *Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones*, Alhambra Mexicana.
- Rajwade, J. M., K. M. Paknikar & J. V. Kumbhar (2015). *Applications of bacterial cellulose & its composites in biomedicine*. Appl Microbiol Biotechnol 99(6): 2491-2511.
- Sáenz, C., A. M. Estévez & S. Sanhueza (2007). "Utilización de residuos de la industria de jugos de naranja como fuente de fibra dietética en la elaboración de alimentos." Archivos latinoamericanos de Nutrición 57(2): 186.
- Saucedo-Castaneda, G., M. Gutierrez-Rojas, G. Bacquet, M. Raimbault & G. Viniegra-Gonzalez (1990). *Heat-Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation*. Biotechnology & Bioengineering 35(8): 802-808.
- Sauri Riancho, M. R., H. A. Nájera Aguilar, J. G. Ramírez Herrera & G. M. Mejía Sánchez (2002). *Aplicación del composteo como método de tratamiento de los residuos de frutas producidos en zonas de alta generación*. Ingeniería 6(1).
- Shuler, M. L. & F. Kargi (2002). *Bioprocess engineering*. Upper Saddle River, NJ, E.U.A.: Prentice Hall.
- Singh, R. P. & D. R. Heldman (2001). *Introduction to food engineering*, Gulf Professional Publishing.
- Soler, A. & G. Buitrago (2010). *Evaluación de la transferencia de oxígeno en cultivos con lactococcus lactis empleando un sistema de fermentación con aireación externa*. Revista Colombiana de Biotecnología 12(2).

- Suárez Alonso, A. & F. Palomar Llatas (2012). *Injertos autólogos con sellos de piel. Enfermería dermatológica* (16).
- Sun, Y. & J. Cheng (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource technology* 83(1): pp. 1-11.
- Tejada Mansir, A., R. M. Montesinos Cisneros & R. Guzmán Zamudio (2011). *Bioseparaciones*. México, Pearson Educación de México.
- Toledo, R. T. (2007). *Fundamentals of food process engineering, Springer Science & Business Media*.
- Torres López, A. M., J. C. Quintero Díaz & L. Atehortúa Garcés (2008). *Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno*.
- Waks, L. J. (1997). *The project method in postindustrial education*. *Journal of Curriculum Studies* 29(4): pp. 391-406.
- Wall, K. (2010). *Engineering: issues, challenges & opportunities for development*, UNESCO.
- WHO, Violence & Injury Prevention. Recuperado de: 18 agosto 2017, http://www.who.int/violence_injury_prevention/other_injury/burns/en/.
- Wiley, J. M., L. M. Sherwood & C. J. Woolverton (2013). *Applied Environmental Microbiology*. Prescott's Microbiology, McGraw Hill International.
- Wiley, J. M., L. M. Sherwood & C. J. Woolverton (2013). *Biotechnology & Microbiology*. Prescott's Microbiology, McGraw Hill International.
- Yepes, S. M., N. Montoya, J. Lina & F. Orozco (2008). *Valorización de residuos agroindustriales-frutas-en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 61(1): pp. 4422-4431.
- Zhang, J. (2010). *Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production*.

Capítulo 4

Biotecnología de microalgas

*Marcia Morales Ibarría **

*Raúl Muñoz Torre ***

Introducción general

La producción de biomasa microalgal es una alternativa para desarrollar diversos proyectos tecnológicos con la finalidad de: reducir las emisiones de dióxido de carbono (CO_2) y elaborar combustibles renovables de tercera generación o productos de alto valor agregado (ácidos grasos poliinsaturados o pigmentos) con aplicación en los sectores de alimentos, industria farmacéutica y cosmética.

Las microalgas son organismos fotosintéticos que convierten la luz del sol en energía química, fijando CO_2 y transformándolo en biomasa. Estos microorganismos son de gran interés ya que presentan: una alta productividad por área de cultivo, gran eficiencia fotosintética, elevadas tasas de crecimiento, en comparación con las plantas superiores; además, su cultivo puede hacerse en condiciones no propicias para estas. La producción de biomasa también tiene implicaciones ambientales importantes; ya que puede contribuir a: reducir las emisiones de CO_2 liberadas a la atmósfera por procesos industriales, coadyuvar en el tratamiento de aguas residuales y ser materia prima para la elaboración de diferentes tipos de biocombustibles. Entre estos se encuentran: el biohidrógeno, el biodiesel, el bioetanol, y el biogás, inclusive las microalgas pueden depurar éste último, a través de la remoción de CO_2 , para tener un combustible enriquecido en metano.

En este capítulo se plantean problemas relacionados con estequiometría, cinética y diseño de sistemas de cultivo de microalgas; incluyendo: i) los factores que influyen sobre el crecimiento de estos microorganismos, abarcando aspectos nutricionales y ambientales, ii) la determinación de condiciones óptimas de crecimiento y parámetros cinéticos, iii) el uso de la biomasa microalgal para la obtención de biocombustibles como el biogás, iv) un sistema de depuración de biogás, y finalmente, v) la caracterización y desempeño de un fotobiorreactor de placas planas. Previo a cada problema, se proporciona un breve marco teórico que provee el contexto y fundamentos para la solución de estos.

* Depto. de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: mmmorales@correo.cua.uam.mx

** Depto. de Ing. Química y Tecnología Ambiental, Universidad de Valladolid, España. Correo electrónico: mutora@iq.uva.es

Problema 4.1 Representación de crecimiento de microalgas y aspectos nutricionales

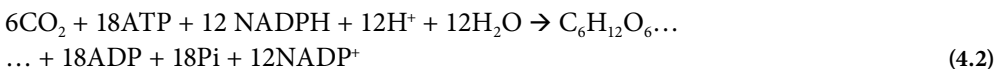
Marco teórico

Las microalgas realizan fotosíntesis oxigénica fijando el CO_2 a través del ciclo de Calvin, obteniendo la energía necesaria para realizar la síntesis de macromoléculas como: proteínas, carbohidratos y lípidos. En este proceso se requiere: energía solar (espectro de luz visible: longitud de onda de 400-700 nm), CO_2 , y nutrientes. La fotosíntesis es: un proceso de óxido-reducción en el que existe una transferencia de electrones. El agente reductor es el agua, y la molécula que se reduce es el dióxido de carbono, que acepta electrones del agua para transformarse en glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

El proceso de fotosíntesis engloba dos subprocesos: en el primero se realizan las reacciones luminosas, donde se utiliza la energía solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del H_2O y la liberación del O_2 . Se consigue que el agente oxidante NADP^+ se reduzca a NADPH , produciendo equivalentes reductores, y la energía luminosa se captura mediante la fotofosforilación (Richmond, 2004).



En el segundo subproceso, llamado de reacciones oscuras que involucran al ciclo de Calvin, el NADPH y el ATP producidos, se utilizan para la síntesis reductora de los carbohidratos a partir del CO_2 y el agua (Richmond, 2004).



La formulación estequiométrica de la reacción global de la fotosíntesis corresponde a la relación de conservación de la materia de los elementos: C, H, O, N, S, P, entre otros; y de su interacción en el metabolismo celular. Si se cuenta con el análisis elemental de la biomasa seca de una microalga, se puede establecer una fórmula química promedio y el crecimiento puede expresarse en la forma de una ecuación estequiométrica. Se ha encontrado que la estequiometría de la ecuación que se utiliza para el crecimiento fotosintético, varía poco con respecto a la especie cultivada y la iluminación; en contraste se ha probado que tanto el estrés nutricional como la fuente de nutrientes, influencia fuertemente la composición de la biomasa.

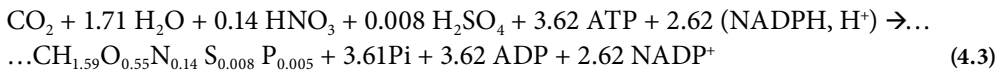
Al igual que para cualquier reacción biológica, una ecuación estequiométrica es útil para: i) convertir las tasas de crecimiento en tasas de consumo de sustratos o de formación de producto, ii) para determinar los requerimientos nutricionales (especialmente en términos de: nitrógeno, fósforo y fuentes de azufre para los organismos fotosintéticos), iii) para comprender el intercambio CO_2/O_2 , iv) el cambio en el pH relacionado con el CO_2 cuando las relaciones estequiométricas se expresan en términos de las especies iónicas. También se pueden plantear ecuaciones estructuradas más sofisticadas, si se tiene una comprensión a nivel celular sobre el acoplamiento entre la cinética, estequiometría y energía en los procesos de fotosíntesis. Estas ecuaciones involucran los balances estequiométricos asociados a la producción de ATP en el proceso de fotosíntesis, y se incluyen cofactores tales como NADPH, H^+

Un coeficiente que es de utilidad para la comparación de diferentes sistemas de cultivo o uso de nutrientes, es el cociente fotosintético $Q_p = \text{O}_2/\text{CO}_2$, que se ha utilizado para la comparación de diferentes fuentes de nitrógeno, además se ha encontrado que el nitrógeno tiene un mayor impacto en la ecuación estequiométrica y balance redox, más que en la fórmula de la biomasa.

Enunciado del problema

Se cuenta con la información de la composición elemental de la cianobacteria *Spirulina platensis*, la cual arroja la siguiente fórmula: $\text{CH}_{1.59}\text{O}_{0.55}\text{N}_{0.14}\text{S}_{0.008}\text{P}_{0.005}$. Se ha profundizado en el conocimiento de la fotosíntesis de este mismo organismo además se sabe que, para una irradiancia de $500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se requieren de 3.62 ATP y que la relación molar ATP/NADPH₂ es de 1.38; de acuerdo a las siguientes reacciones (Cornet, Dussap et al, 1998):

Modelo estructurado para crecimiento para *Spirulina platensis*:



Esta ecuación está asociada con el correspondiente par estequiométrico de las ecuaciones del esquema Z para la fotosíntesis:



Resuelva cada uno de los siguientes incisos

- i. Calcule los rendimientos teóricos $Y_{\text{HCO}_3^-/X}$, $Y_{\text{NO}_3^-/X}$, $Y_{\text{SO}_4^{2-}/X}$ y $Y_{\text{HPO}_4^{2-}/X}$ para el caso de la estequiometría simple. Plantee la ecuación estequiométrica considerando que: la fuente de carbono es el CO_2 , la del nitrógeno es nitrato, la del fósforo es fosfato y la del azufre es sulfato.
- ii. ¿Cuánto nitrato de sodio se requerirá para obtener dos toneladas de biomasa?
- iii. Si en lugar de usar nitrato como fuente de nitrógeno se utilizara amonio, ¿cómo cambiarían la ecuación estequiométrica general? y ¿en qué caso sería más eficiente la asimilación de nitrógeno?; fundamente su respuesta.
- iv. Justifique porqué en la mayoría de los medios de cultivo de microalgas se usa nitrato como fuente de nitrógeno, para ello, analice las propiedades de las distintas fuentes de nitrógeno involucradas en este problema y considere la respuesta de la pregunta anterior.
- v. Analice cual sería el reactivo limitante en el medio Zarrouk, si se asume que la irradiancia es suficiente para permitir el crecimiento de la biomasa.

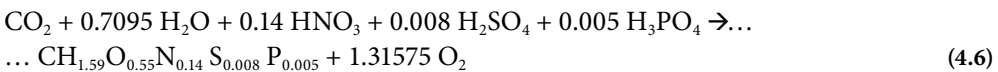
Solución

Para detalles sobre los cálculos realizados, ver la hoja Excel titulada: Problema 1.

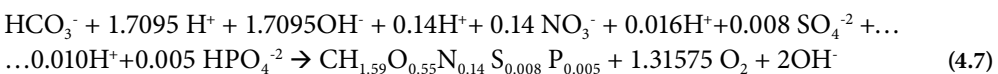
a) Calcule los rendimientos teóricos $Y_{\text{HCO}_3^-/X}$, $Y_{\text{NO}_3^-/X}$, $Y_{\text{SO}_4^{2-}/X}$ y $Y_{\text{HPO}_4^{2-}/X}$, para el caso de la estequiometría simple.

a.1) Plantear y balancear la ecuación estequiométrica

Modelo simple para crecimiento para *Spirulina platensis*



a.2) Plantear y balancear la ecuación en su forma iónica



a.3) Calcular los pesos moleculares de los componentes involucrados en el balance de crecimiento, (tabla 4.1).

Tabla 4.1. Peso molecular de especies químicas involucradas.

Especie química	Peso molecular g gmol ⁻¹
Biomasa	24.761
HCO ₃ ⁻	61
NO ₃ ⁻	62
SO ₄ ⁻²	96
HPO ₄ ⁻²	96

a.4) Calcular los rendimientos solicitados (tabla 4.2).

Tabla 4.2. Rendimientos de macronutrientes biomasa.

Rendimiento	Valor
Y _{HCO3-/X}	2.46 g _{HCO3-/g_X}
Y _{NO3-/X}	0.35 g _{NO3-/g_X}
Y _{SO4-/X}	0.031 g _{SO4-/g_X}
Y _{HPO4-/X}	0.019 g _{HPO4-/g_X}

b) ¿Cuánto nitrato de sodio se requerirá para obtener 2 toneladas de biomasa?

b.1) Recordar los valores de los rendimientos calculados en el inciso anterior y seleccionar el del nitrato (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Rendimientos nitrato-biomasa.

Rendimiento	Valor
Y _{NO3-/X}	0.35 g _{NO3-/g_X}

b.2) Calcular con base a lo anterior, la cantidad del ion nitrato que se necesita para producir dos toneladas de biomasa

Para producir 1 ton de biomasa se requieren 0.35 ton NO₃⁻

Entonces para elaborar dos toneladas se requerirán 0.70 ton NO₃⁻

b.3) Calcular el peso molecular del NaNO_3 y determinar la fracción del ion NO_3^- que contiene (tabla 4.4)

Tabla 4.4. Fracción nitrato en NaNO_3

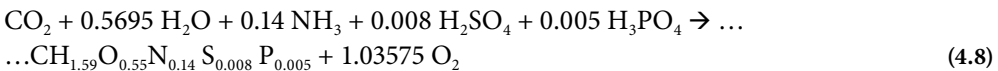
Especie química	Peso molecular	Fracción NO_3^-
NaNO_3	61 g mol^{-1}	0.7294

b.4) Calcular la cantidad de NaNO_3 necesaria

En el paso b.2, se estableció que; para producir dos toneladas de biomasa se requieren 0.70 ton NO_3^- ; para calcular la cantidad de NaNO_3 , hay que considerar que el nitrato solo representa el 72.94% del peso del compuesto; por lo tanto, la cantidad necesaria es de 0.96 toneladas.

c) Si en lugar de usar nitrato como fuente de nitrógeno se utilizara amonio, ¿cómo cambiaría la ecuación estequiométrica general? ¿En qué caso sería más eficiente la asimilación de nitrógeno?, fundamente sus respuestas.

c.1) Plantear y balancear la ecuación



c.2) Analizar los cocientes fotosintéticos de ambos casos

El coeficiente fotosintético, Q_p es la relación que establece cuánto CO_2 se fija con relación al oxígeno liberado; recordar que el O_2 se produce de la descomposición del agua por el fotosistema II para obtener electrones (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Coeficiente fotosintético para uso de nitrato o amonio como fuente de nitrógeno.

Coeficiente fotosintético	Valor $\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{O}_2}^{-1}$
$Q_{p-\text{NO}_3}$	1.31575
$Q_{p-\text{NH}_3}$	1.03575

De esta manera, el sistema que contiene amonio, requiere de menos electrones obtenidos a partir de la descomposición del agua (medido indirectamente a partir de la liberación de O_2) que el nitrato.

d) Justifique porqué en la mayoría de los medios de cultivo de microalgas se usa nitrato como fuente de nitrógeno, para ello analice las propiedades de las fuentes de nitrógeno involucradas en este problema y considere la respuesta de la pregunta anterior.

d.1) Determinar los estados de oxidación del nitrógeno en las moléculas de nitrato y amoniac (tabla 4.6)

Tabla 4.6. Estado de oxidación del nitrógeno en el nitrato de sodio y amoniaco.

Fuente de nitrógeno	Estado de oxidación del N
$NaNO_3$	+5
NH_3	-3

d.2) Investigar la forma de asimilación del nitrógeno en las microalgas

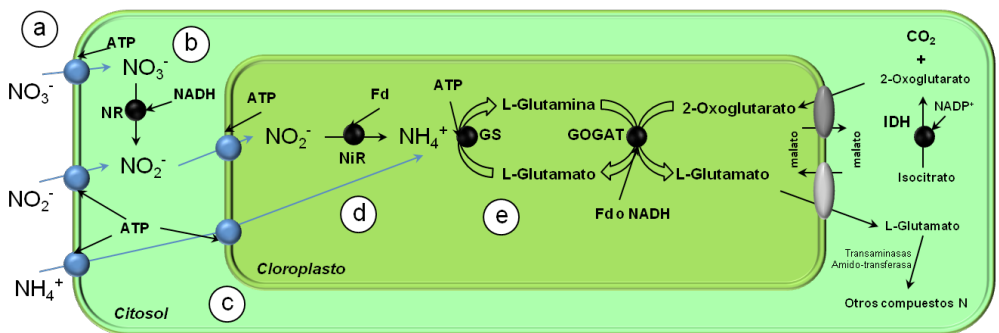


Figura 4.1. Diagrama de consumo de las distintas fuentes de nitrógeno en las microalgas.

Para asimilar el nitrato, la molécula tiene que transportarse a través de la membrana celular y luego reducirse a amonio, para lo cual se consume una gran cantidad de energía, carbono y protones. Este proceso causa también un incremento en el pH; caso contrario a lo observado durante el consumo de amonio, el cual disminuye el pH. Sólo dos enzimas participan en el metabolismo del nitrato: la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa

(NiR). La NR cataliza la reducción del nitrato a nitrito, usando nucleótidos de piridina como donador de electrones; y la NiR cataliza la reducción del nitrito a amonio, usando ferredoxina como donador de electrones en la reacción que involucra la transferencia de 6 electrones.

Por otro lado, el estado de oxidación del nitrógeno en el nitrato es de +V y se requiere pasar a -III, que es la forma en que asimila el nitrógeno la microalga; por lo que debe reducirse y ganar electrones. Por otro lado, la pérdida de nitrógeno (N) por volatilización del gas amoníaco (NH_3), puede ser la principal causa de la baja eficiencia ya que se ha reportado que existe cierta toxicidad al amonio por parte de las microalgas.

d.3) Investigar la solubilidad y partición de los compuestos entre las fases gaseosas y líquida (tabla 4.7)

Tabla 4.7. Propiedades físico-químicas del nitrato de sodio y amoniaco.

Fuente de nitrógeno	Solubilidad g/100mL _{25°C}	Constante de Henry atm·m ³ mol ⁻¹ K ⁻¹	m=C _g /C _L
NaNO ₃	92.1	Aprox. 0	Aprox. 0
NH ₃	89.9	1.6 E-6	6.5 E-5

Como se puede observar ambas moléculas son bastante solubles, sin embargo, sí existe una partición entre la fase gas y líquida en el caso del amonio.

d.4) Analizar la disociación de los compuestos en fase acuosa

El NaNO₃ es una sal derivada del HNO₃ que es un ácido fuerte, mientras que la disolución del NH₃ es una base débil.

Por otro lado, cuando el amoniaco se solubiliza se disocia en el ion amonio, sin embargo, a pH superiores a la neutralidad y con altas temperaturas el amoniaco tiende a volatilizarse:



Y la influencia del pH sobre el equilibrio de las diferentes especies es (tabla 4.8):

Tabla 4.8. Distribución de especies químicas del amoníaco a diferentes pH.

pH	% NH ₃ libre	% ion NH ₄
6	0	100
7	1	99
8	4	96
9	25	75
10	78	22
11	96	4

Por todas las razones anteriores, pero principalmente por las pérdidas por volatilización, se prefiere al nitrato como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo.

e) Analice cuál sería el reactivo limitante en el medio Zarrouk, si se asume que la irradiancia es suficiente para permitir el crecimiento de la biomasa

e.1) Investigar la composición del medio Zarrouk (tabla 4.9)

Tabla 4.9. Composición del medio Zarrouk.

Componente	Concentración (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	18
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
Na ₂ EDTA	0.08
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Solución de micronutrientes	1 ml

e.2) Calcular la cantidad de los macronutrientes C, N, P, S en su forma iónica, con base a la composición de las sales del medio y la fracción de las especies iónicas analizadas (tabla 4.10)

Tabla 4.10. Fracciones y concentraciones de especies iónicas en medio Zarrouk.

Componente	Cantidad (g L ⁻¹)	Fracción de especie iónica	Cantidad especie iónica (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	18	0.726	HCO ₃ ⁻ 13.07
K ₂ HPO ₄	0.5	0.552	HPO ₄ ²⁻ 0.275
NaNO ₃	2.5	0.729	NO ₃ ⁻ 1.823
K ₂ SO ₄	1	0.552	SO ₄ ²⁻ 0.552
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.390	SO ₄ ²⁻ 0.078
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.345	SO ₄ ²⁻ 0.0034

El nitrato es el reactivo limitante, ya que de acuerdo a los rendimientos y la composición del medio es el que produciría menos biomasa.

e.3) Retomar los coeficientes estequiométricos (tabla 4.11)

Tabla 4.11. Rendimientos para los diferentes macronutrientes con base a la estequiometría.

Componente	Cantidad (g L ⁻¹)	Rendimiento	Valor
HCO ₃ ⁻	13.07	Y _{HCO3-/X}	2.46 g _{HCO3-/g_X}
HPO ₄ ⁻²	0.275	Y _{NO3-/X}	0.35 g _{NO3-/g_X}
NO ₃ ⁻²	1.823	Y _{SO4-/X}	0.031 g _{SO4-/g_X}
SO ₄ ⁻²	0.633	Y _{HPO4-/X}	0.019 g _{HPO4-/g_X}

e.4) Calcular la biomasa que se podría producir con cada uno de los macronutrientes C, N, P, S con base a la composición del medio (tabla 4.12)

Tabla 4.12. Resultados teóricos de la biomasa producida partir de los macronutrientes del medio Zarrouk (tabla 4.9).

Componente	Biomasa (g L ⁻¹)
X - HCO ₃ ⁻¹	5.31
X - HPO ₄ ⁻²	14.23
X - NO ₃ ⁻²	5.20
X - SO ₄ ⁻²	20.42

A partir de la tabla 4.12, se puede concluir que: el reactivo limitante es la fuente de nitrógeno, NaNO₃, ya que de todos los macronutrientes analizados este es el que produciría menor cantidad de biomasa.

Problema 4.2 Aspectos cinéticos en el cultivo de microalgas: influencia de temperatura, irradiancia y pH. Determinación de las condiciones óptimas de cultivo y obtención de parámetros cinéticos

Marco teórico

El inconveniente del planteamiento del crecimiento de la microalga con una sola ecuación estequiométrica (ver problema anterior, 4.1.) es que involucra un rendimiento constante, en donde no se consideran las condiciones externas, tales como: la luz, el pH y la temperatura. Aún si estos factores se mantienen en valores óptimos, la luz puede ser el aspecto que limite el crecimiento. Por eso es importante representar la influencia que tiene cada uno de ellos sobre la actividad fotosintética de una microalga.

Efecto de la luz. Este es uno de los factores más importantes en el crecimiento de las microalgas. La relación fundamental entre la fotosíntesis y la luz es representada por las curvas P-I, donde se pueden identificar tres regiones: limitada, saturada e inhibida. A bajas irradiancias, la fotosíntesis es proporcional a esta, ya que se encuentra limitada por la tasa de captura de fotones de la luz. Conforme la irradiancia aumenta, la tasa llega a estar limitada por la reacción posterior a la captura de electrones. Bajo esta condición, la tasa de fotosíntesis es máxima e independiente de la irradiancia proporcionada. A mayores irradiancias, por arriba de un límite, la fotosíntesis decae presentándose la fotoinhibición. La respuesta P-I varía de acuerdo a la especie, además debe determinarse para cada organismo, así como a bajas concentraciones celulares para asegurar que las células estén expuestas a una irradiancia homogénea.

Efecto de la temperatura. La temperatura afecta el crecimiento de las microalgas. Bajas temperaturas decaen la actividad fotosintética, específicamente, los sistemas enzimáticos asociados a la fijación de carbono. Altas temperaturas promueven un incremento en las tasas, pero en rangos superiores al óptimo también causan la desnaturalización e inactivación de proteínas, reduciendo la actividad anabólica hasta que el crecimiento cesa; además, se reduce la solubilidad de CO_2 . El efecto de la temperatura, puede representarse por una ecuación doble de Arrhenius que involucra términos como energía de activación (E_a) y energía de muerte térmica o de activación (E_d). La mayoría de las especies de microalgas son capaces de realizar fotosíntesis entre 15-30°C, con condiciones óptimas entre 20-25°C. Es de suma importancia evaluar el efecto de la temperatura, principalmente en sistemas de cultivo a la intemperie donde se pueden registrar temperaturas extremas o en los que se alimentan con gases de combustión proveniente de procesos industriales.

Efecto del pH. El pH influye en el crecimiento celular, los rangos óptimos se encuentran entre 6-8, pero existen organismos como la *Spirulina*, que se han adaptado a ambientes alcalinos (pH 9-11), también hay otras especies que toleran pH tan bajos como 4. El pH del medio influye sobre las diferentes fuentes de carbono inorgánico disueltas (DIC), particularmente sobre el CO_2 y el HCO_3^- . Variaciones en el pH pueden ocurrir por cambios en la concentración del CO_2 disuelto o por alteraciones en su consumo, debido al crecimiento de la biomasa. Además, el uso de compuestos iónicos como amonio, nitrato, fosfatos provocan cambios en el pH y se hace necesaria la reformulación del medio de cultivo o la adición de agentes neutralizantes.

La influencia de estos aspectos, aunados a algunos parámetros relacionados con la hidrodinámica y transferencia de masa en los fotobiorreactores, puede contribuir a una mejor comprensión de los fenómenos que ocurren; con la finalidad de obtener mejores productividades en los sistemas de cultivo de microalgas.

Enunciado del problema

Se han realizado experimentos para determinar los parámetros cinéticos de la cianobacteria *Spirulina platensis* y establecer las condiciones óptimas de crecimiento considerando factores ambientales como luz, temperatura y pH. Se considera que existe suficiencia nutricional, por lo tanto la irradiancia es el factor limitante de la cinética que sigue una ecuación tipo Monod. Los parámetros cinéticos intrínsecos se determinarán a través de ensayos de actividad fotosintética, P_{O_2} ($\text{mg}_{\text{O}_2} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$); realizando mediciones de oxígeno disuelto en un sistema donde no existen problemas de mezclado, autosombreado y la luz que reciben las células es homogénea. Esta metodología ha demostrado ser una herramienta útil y rápida para evaluar el efecto de los factores ambientales sobre la fotosíntesis y también para establecer las condiciones de crecimiento óptimas (Cabello, Toledo-Cervantes et al, 2015).

Con base en la información presentada en las tablas, responda cada uno de los incisos:

- i. Determine las condiciones óptimas de pH y temperatura con los siguientes datos que se obtuvieron en la zona de saturación (tabla 4.13).

Tabla 4.13. Efecto de pH y temperatura sobre la actividad fotosintética, P_{O_2} .

pH	P_{O_2} ($\text{mg}_{O_2} \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	P_{O_2} ($\text{mg}_{O_2} \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$)
5	4.02	15	68.41
6	70.89	20	94.97
7	86.70	25	98.46
8	102.30	30	122.75
9	126.24	35	106.12
10	122.87	38	76.26
11	113.58		
12	89.69		

- ii. Calcule la energía de activación (E_a), y la constante de frecuencia (k_0) en la ecuación de Arrhenius, para representar el efecto favorable de la temperatura sobre la actividad fotosintética, así como los parámetros cinéticos asociados a la influencia de la luz sabiendo que se ajusta a un cinética tipo Monod (K_s) (tabla 4.14).

Tabla 4.14. Curvas P-I para el cultivo *Spirulina platensis* a diferentes temperaturas.

I ($\text{mmol m}^{-2}\text{h}^{-1}$)	P_{O_2} ($\text{mg}_{O_2} \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$)			
	15 $^{\circ}\text{C}$	20 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$
22	6.56	14.89	14.97	15.04
116	25.71	48.77	51.52	54.26
475	53.12	81.58	91.15	100.72
542	55.49	83.83	94.06	104.29
745	60.70	88.55	100.25	111.95
900	63.45	90.91	103.385	115.86
993	64.76	92.01	104.86	117.71
1352	68.41	94.97	108.86	122.75

- iii. Determine el coeficiente de absorción de luz por la biomasa, K_a ($\text{m}^2 \text{g}_x^{-1}$), el cual permitirá calcular la irradiancia promedio al interior del biorreactor, por medio del análisis de los resultados presentados en la tabla 4.15, obtenidos a diferentes concentraciones de la biomasa, y el uso de la ecuación de la ley de Beer-Lambert

$I_r = I_0 \exp(-K_a X r)$, donde: I_0/I_r es una medida de la atenuación de la luz detectada a una distancia r ; que para el caso en cuestión, esta es de 4.4 mm ocasionada por la biomasa X , que se varió entre 0.1 y 1 g L⁻¹.

Tabla 4.15. Efecto de la concentración de biomasa sobre atenuación de la luz.

Biomasa (g L ⁻¹)	Ln (I ₀ /I _r) a 357 mmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I ₀ /I _r) a 624 mmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I ₀ /I _r) a 981 mmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I ₀ /I _r) a 2370 mmol m ⁻² s ⁻¹
0	0	0	0	0
0.1	0.041	0.022	0.014	0.004
0.5	0.149	0.172	0.129	0.22
1	0.41	0.465	0.44	0.478

Solución

Para más detalles, consulta el archivo de Excel titulado Problema 2

a) Determine las condiciones óptimas de pH y temperatura con los siguientes datos que se obtuvieron en la zona de saturación de luz (tabla 4.13)

a.1) Graficar los datos (figura 4.2 y 4.3)

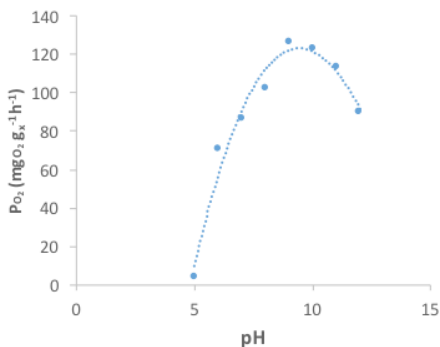


Figura 4.2. Influencia del pH vs P_{O₂}

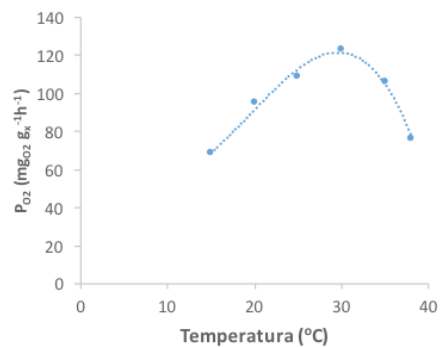


Figura 4.3. Influencia de la temperatura vs P_{O₂}

Si bien los valores óptimos pueden obtenerse por visualización directa, es importante determinar los valores numéricos formalmente.

a.2) Determinar las fórmulas de ajuste

Las ecuaciones de ajuste de obtuvieron en Excel. Para el caso de los datos de pH se tiene, con un $R^2=0.9671$:

$$P_{O_2} = 0.1543 \text{ pH}^3 - 9.4843 \text{ pH}^2 + 137.55 \text{ pH} - 460.23 \quad (4.11)$$

Para el caso de los datos de temperatura se tiene, con un $R^2=0.98373$:

$$P_{O_2} = -0.0166 T^3 + 0.9816 T^2 + 14.623 T + 123.73 \quad (4.12)$$

a.3) Encontrar el valor máximo a través de la derivación de la ecuación e igualación a cero, y obteniendo las raíces de las expresiones resultantes

Para el caso de los datos de pH se tiene lo siguiente primero se deriva la ecuación (4.12):

$$P_{O_2}' = 0.4638 \text{ pH}^2 - 18.9686 \text{ pH} + 137.55 \quad (4.13)$$

La ecuación anterior se iguala a cero:

$$0 = 0.4638 \text{ pH}^2 - 18.9686 \text{ pH} + 137.55 \quad (4.14)$$

La ecuación anterior es de segundo orden y las raíces, que representan los valores máximos y mínimos, pueden obtenerse a partir de la fórmula general cuadrática. Las raíces que satisfacen esa ecuación son:

$$\text{pH}_1 = 31.7 \quad (4.15)$$

$$\text{pH}_2 = 9.27 \quad (4.16)$$

No existe un valor de pH mayor de 12, por lo tanto, se descarta la raíz de la ecuación (4.15).

Repitiendo los pasos anteriores se pueden calcular los máximos y mínimos para el caso de los datos de temperatura:

$$P_{O_2}' = -0.0498 T^2 + 1.9632 T - 14.6237 \quad (4.17)$$

$$0 = -0.0498 T^2 + 1.9632 T - 14.623 \quad (4.18)$$

$$T1=29.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (4.19)$$

$$T2=10 \text{ }^{\circ}\text{C} \quad (4.20)$$

En este caso la temperatura de operación más cercana a la de operación del biorreactor es la raíz de la ecuación (4.19). Por lo tanto, las condiciones óptimas de pH y temperatura son 9.2 y 29.5 °C, respectivamente.

b) Calcule la energía de activación (E_a), la constante de frecuencia (k_0) en la ecuación de Arrhenius, para representar el efecto favorable de la temperatura sobre la actividad fotosintética, así como los parámetros cinéticos asociados a la influencia de la luz sabiendo que se ajusta a una cinética tipo Monod (K_s)

b.1) Establecer el modelo que representa la cinética en función de la irradiancia y temperatura, que involucre dichas variables y parámetros antes mencionados. Consultar referencia (Morales, Cabello et al, 2015).

La fórmula es:

$$P_{O_2} = \frac{K_0 \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) I}{K_s + I} \quad (4.21)$$

En esta ecuación:

E_a es la energía de activación;

I es la irradiancia;

K_s corresponde a la constante de saturación;

K_0 es el factor de frecuencia asociado a la ecuación de Arrhenius;

P_{O_2} es la actividad fotosintética;

P la constante de los gases ideales tiene un valor de 1.9871 cal mol⁻¹k⁻¹;

T es la temperatura;

b.2) Con los datos proporcionados en la tabla 2 (ver la hoja con nombre "inciso b" en el libro de Excel Problema 2) realizar un ajuste multivariable no lineal en el software Mathematica de Wolfram® (figura 4.4)

```

In[14]:= data = {{288.3, 22., 6.56}, {288.3, 116., 25.71}, {288.3, 475., 53.12},
{288.3, 542., 55.49}, {288.3, 745., 60.7}, {288.3, 900., 63.45},
{288.3, 993., 64.76}, {288.3, 1352., 68.41}, {293.3, 22., 14.89},
{293.3, 116., 48.77}, {293.3, 475., 81.58}, {293.3, 542., 83.83},
{293.3, 745., 88.55}, {293.3, 900., 90.91}, {293.3, 993., 92.01},
{293.3, 1352., 94.97}, {298.3, 22., 14.97}, {298.3, 116., 51.52},
{298.3, 475., 91.15}, {298.3, 542., 94.06}, {298.3, 745., 100.25},
{298.3, 900., 103.385}, {298.3, 993., 104.86}, {298.3, 1352., 108.86},
{303.3, 22., 15.04}, {303.3, 116., 54.26}, {303.3, 475., 100.72},
{303.3, 542., 104.29}, {303.3, 745., 111.95}, {303.3, 900., 115.86},
{303.3, 993., 117.71}, {303.3, 1352., 122.75}};

In[21]:= nlm = NonlinearModelFit[data,
(theta1 * Exp[-theta2 / (Temp * 1.98717)] * Irr) / (theta3 + Irr),
{theta1, theta2, theta3}, {Temp, Irr}]

Out[21]= FittedModel[ $\frac{3.9388 \times 10^6 e^{-\frac{19871.7}{Temp} \text{Irr}}}{169.197 + \text{Irr}}$ ]

In[22]:= nlm[{"ParameterTable", "RSquared"}]

Out[22]= {


|        | Estimate             | Standard Error        | t-Statistic | P-Value                   |
|--------|----------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|
| theta1 | $3.9388 \times 10^6$ | $2.63051 \times 10^6$ | 1.49735     | 0.145108                  |
| theta2 | 6167.52              | 394.974               | 15.615      | $1.18611 \times 10^{-15}$ |
| theta3 | 169.197              | 19.695                | 8.59089     | $1.83771 \times 10^{-9}$  |


, 0.995855}

```

Figura 4.4. Captura de pantalla de los resultados del ajuste en Mathematica®

b.3) Extraer los valores y analizar el coeficiente de correlación para determinar la confiabilidad del ajuste realizado (tabla 4.16)

En el caso analizado y a partir de la figura anterior se tiene que:

Tabla 4.16. Valores de constantes cinéticas obtenidas del ajuste multivariable no lineal.

Nomenclatura Mathematica	Parámetro modelo ¹	Valor	Unidades	R ²
Theta 1	K _o	3.9388 E6	mgO ₂ g _x ⁻¹ h ⁻¹	0.995855
Theta 2	E _a	6 167.52	cal mol ⁻¹	
Theta 3	K _s	169.197	mmol m ⁻² s ⁻¹	

Como se puede observar, el coeficiente de correlación es muy alto; por lo que se puede utilizar este modelo y usar los parámetros con alta confiabilidad. Los valores se presentan en la tabla anterior (4.16).

c) Determine el coeficiente de absorción de la biomasa, este parámetro permite calcular la irradiancia promedio al interior del biorreactor

c.1) Analizar la ecuación de Beer-Lambert y fijar la estrategia para el cálculo de K_a

$$\frac{I_r}{I_o} = \exp(-K_a \cdot X \cdot r) \quad (4.22)$$

donde:

I_r / I_o corresponde al nivel de atenuación de la luz (-);

K_a es la constante de absorción de la luz;

X es la concentración de biomasa;

r es la longitud de la trayectoria de luz;

Si se aplica logaritmo a ambos lados de la ecuación se tiene:

$$\text{Ln} \left(\frac{I_r}{I_o} \right) = -K_a \cdot X \cdot r \quad (4.23)$$

Que también se puede expresar como:

$$\text{Ln} \left(\frac{I_o}{I_r} \right) = K_a \cdot X \cdot r \quad (4.24)$$

En esta ecuación los valores de X y r se conocen, por lo tanto, el de K_a puede calcularse al hacer la regresión lineal de la representación gráfica en el eje Y del logaritmo, y en el eje X del producto de $X \cdot r$.

c.2) Hacer las conversiones y arreglos necesarios en los datos (tabla 4.17)

Tabla 4.17. Valores necesarios para calcular la constante de absorción.

(g m ⁻³)	Xr	Ln (I _o /I _r) a 357 μmmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I _r /I _o) a 624 μmmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I _r /I _o) a 981 μmmol m ⁻² s ⁻¹	Ln (I _r /I _o) a 2370 μmmol m ⁻² s ⁻¹
0	0	0	0	0	0
100	0.415	0.041	0.022	0.014	0.004
500	2.075	0.149	0.172	0.129	0.22
1000	4.15	0.41	0.465	0.44	0.478

c.3) Hacer la representación de los datos para obtener la pendiente, que en este caso será K_a y el coeficiente de correlación (figura 4.5)

Los datos de la tabla representan la atenuación de la luz resultante del incremento de la biomasa, K_a se calcula usando la regresión lineal entre la representación de los datos, I_r / I_o , y la concentración de la biomasa (X).

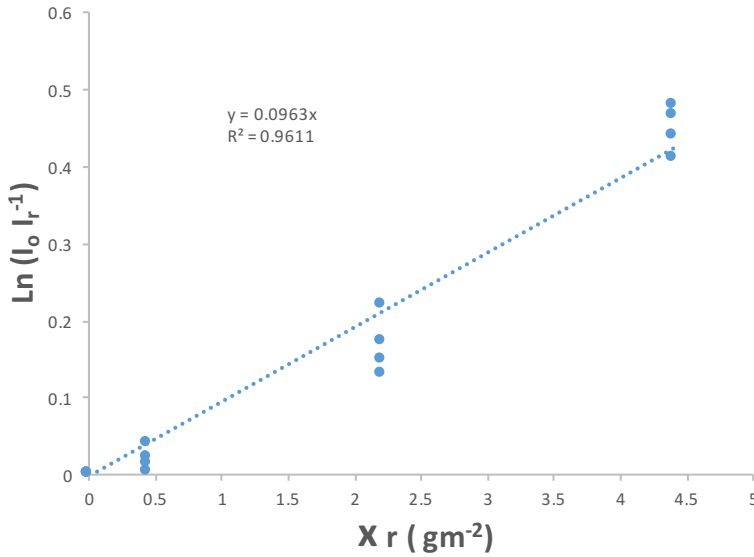


Figura 4.5. Ajuste lineal para obtención de K_a . El valor de $K_a = 0.096 m^2 g^{-1}$.

Problema 4.3 Caracterización de un cultivo microalgal y evaluación del desempeño de un fotobiorreactor de placas planas para la captura de CO₂ y producción de lípidos

Marco teórico

Los sistemas de cultivo de microalgas se clasifican en cerrados y abiertos; los sistemas abiertos incluyen: estanques poco profundos, canales abiertos, estanques circulares y tipo carrusel. Por otra parte, los sistemas cerrados o completamente hidráulicos se conocen como fotobiorreactores, estos sistemas representan los únicos métodos para la producción de microalgas a gran escala. En todos los casos, el crecimiento óptimo es el objetivo biotecnológico, y la clave del éxito son factores como: la luz, temperatura, nutrientes y el grado de mezclado.

Los cultivos abiertos comprenden: sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito (*raceway ponds*), estos últimos son los más utilizados. Los estanques de tipo *raceway* consisten en circuitos de 15 a 30 cm de profundidad, en los cuales la circulación del cultivo líquido se hace a través de paletas para promover un adecuado mezclado del sistema. Este tipo presentan una baja productividad en la generación de biomasa, ya que la concentración es de alrededor de 1 g L⁻¹ con productividades de alrededor 10-25 g m⁻² d⁻¹. Estos también son utilizados para la producción de metabolitos y el tratamiento de aguas residuales. Las ventajas que presentan estos sistemas son: su sencillez estructural, bajo costo de construcción, facilidad de operación y mantenimiento. Sin embargo, también presentan diversos inconvenientes como son: la pérdida de agua por evaporación, transferencia limitada de CO₂ al cultivo por su baja concentración en el aire (0.035% v/v) y su difusión, control limitado de las condiciones de cultivo, alta susceptibilidad a contaminarse, productividades reducidas de biomasa y penetración de la luz limitada.

Los fotobiorreactores son sistemas de cultivo donde una gran proporción de la luz no incide directamente sobre la superficie de este, sino que pasa a través de las paredes del reactor que contiene el cultivo de células. Debido a lo anterior, los fotobiorreactores no permiten o limitan el intercambio de materiales contaminantes entre el cultivo y la atmósfera.

Los sistemas cerrados o fotobiorreactores tienen diversas configuraciones tubulares: vertical, horizontal, helicoidal, conformación α , paneles planos y columnas de burbujeo; con el propósito de captar energía. Los más usados son los reactores tubulares y los de paneles planos. Estos sistemas ofrecen muchas ventajas como son: pérdidas mínimas de CO_2 , riesgo reducido de contaminación, control y reproducibilidad de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción, así como productividades altas. Las desventajas en estos sistemas son: los costos atribuidos a la energía invertida en la agitación mecánica de los cultivos con la finalidad de favorecer la transferencia de gases.

La caracterización de los aspectos cinéticos de los sistemas de cultivo se hace a través de los siguientes parámetros:

Los valores de la concentración de biomasa en el transcurso del tiempo del cultivo se usan para construir curvas de crecimiento, y para calcular la tasa de crecimiento específico (μ) con la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_t - \text{Ln } X_o}{t - t_o} \quad (4.25)$$

La tasa de duplicación es igual a:

$$t_d = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} \quad (4.26)$$

La productividad de biomasa (P) se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P = \frac{X_t - X_o}{t - t_o} \quad (4.27)$$

La productividad lipídica (P_{Lip}) se determina de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{Lip} = \mu \cdot L \cdot X \quad (4.28)$$

Donde:

X es la concentración de biomasa;

μ es la tasa de crecimiento específico;

L es el contenido de lípidos al tiempo (t).

La tasa de fijación de carbono (P_{CO_2}) puede calcularse con:

$$P_{CO_2} = C_c \cdot P \cdot \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (4.29)$$

Donde:

M_c es el peso molecular del carbono;

M_{CO_2} es el peso molecular del CO_2 ;

C_c es el contenido de carbono en la biomasa;

La concentración de lípidos ($g_{lip} L^{-1}$), se determina con el contenido de estos y la concentración de biomasa en el mismo periodo de tiempo.

$$C_{lip} = L X \quad (4.30)$$

La eficiencia fotosintética (PE), se calcula con base a la cantidad de irradiación suministrada en el sistema; o con la radiación solar, para el caso de los cultivos a la intemperie.

$$PE = \left(\frac{X_t \cdot V \cdot \Delta H \cdot E_N}{E \cdot A \cdot I_t} \right) 100 \quad (4.31)$$

Donde:

X_t es la biomasa formada en un periodo de tiempo determinado ($g L^{-1}$);

A es el área iluminada del reactor;

V es el volumen del reactor;

ΔH es el calor de combustión de la microalga;

I_t es irradiancia que llega al sistema en un periodo determinado ($mol\ fotones\ m^{-2}$);

E_N es un coeficiente que se usa para considerar la cantidad de energía que requiere la microalga para la asimilación del nitrógeno;

E es la energía contenida en la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y tiene un valor de $210\ KJ\ mol\ fotones^{-1}$ (Dillschneider, Steinweg et al, 2013).

Para el calor de combustión (ΔH) existen valores de alrededor de $26.7\ KJ\ g^{-1}$, para biomasa obtenida de un cultivo sin fuente de nitrógeno, con un promedio de lípidos de 54.7%; para una biomasa cosechada de un cultivo con nutrientes completos y un contenido de lípidos de 18.1%, fue de $20.6\ KJ\ g^{-1}$. El coeficiente de asimilación de nitratos (E_N) se encuentra alrededor de 1.25 (Williams & Laurens, 2010).

El rendimiento, Y_{lip} , se determina dividiendo la cantidad de lípidos producidos en un tiempo fijo entre la cantidad de luz suministrada en ese periodo.

Enunciado del problema

La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* aislada de los ecosistemas acuáticos de Cuatro Ciénegas Coahuila, se ha trabajado por el grupo de la UAM-Cuajimalpa. Dentro de los fotobiorreactores utilizados para su cultivo se encuentra uno de placas planas, que se muestra en la figura 4.6.

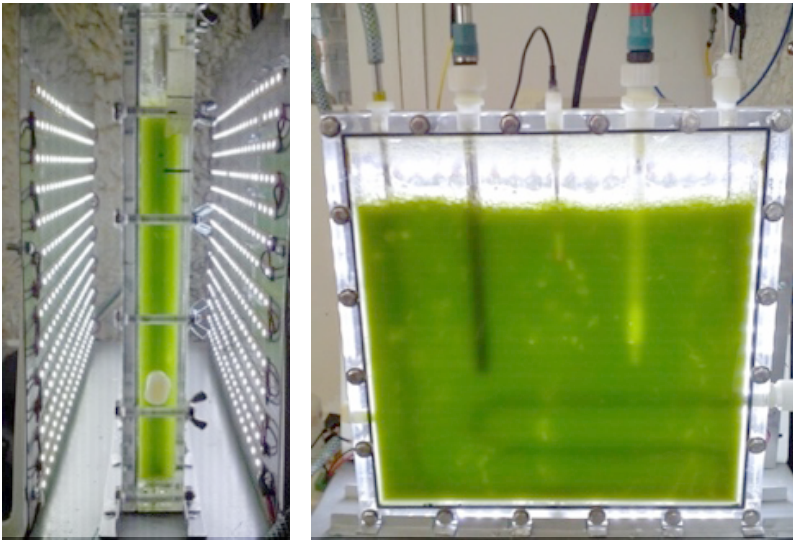


Figura 4.6. Fotobiorreactor de placas planas.

Características del sistema

2 paneles LED de intensidad ajustable

Control de temperatura

Control del pH mediante el suministro de CO_2

1.8 L de medio BG11 (Con y sin N-NO_3)

Dimensiones del reactor 30 cm x 30 cm

Área 0.09 m²

Las condiciones de operación se muestran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Condiciones de operación en el fotobiorreactor de placas planas.

	Suficiencia nutricional	Limitación de N
pH	8	5.5
Temperatura	35	28.5
Irradiancia	300	200
Luz continua, flujo de aire de 1 vvm, suministro de CO ₂ bajo demanda		

En la tabla 4.19 se presentan los resultados de la cinética de crecimiento.

Tabla 4.19. Cinética de crecimiento bajo condiciones de *suficiencia nutricional y **limitación de nitrógeno para la acumulación de lípido.

Tiempo (d)	Biomasa* (g L⁻¹)	Biomasa** (g L⁻¹)	Lípidos** (%)
0.009	0.256	1.247	10.104
0.731	0.574	1.745	11.633
1.09	0.884	2.336	10.830
1.708	1.632	3.051	14.651
2.152	1.93	3.379	17.461
2.686	2.745	3.478	21.679
3.133	3.156	3.517	22.718
3.704	3.774	3.674	24.360
4.121	3.7275	3.531	24.356
4.687	3.681	3.563	35.953
5.101	3.586	3.776	41.155
5.782	3.485	3.827	35.014
6.124	3.48	3.898	37.635
6.698	3.486	4.046	44.217
7.091		4.042	45.745
7.825		4.159	47.439
7.939		4.168	53.311

Calcular los siguientes índices de desempeño del reactor:

- i. La tasa de crecimiento de la biomasa, tiempo de duplicación, productividad máxima bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno y limitación de nitrógeno.
- ii. La capacidad de captura de CO_2 , determinada mediante análisis elemental de CHONS. El contenido de carbono de la biomasa microalgal es de 48% para el caso de crecimiento con suficiencia nutricional.
- iii. La productividad lipídica.
- iv. La eficiencia fotosintética del sistema de cultivo bajo condiciones de suficiencia nutricional y bajo limitación de nitrógeno.

Solución

a) Calcular la tasa de crecimiento de la biomasa, tiempo de duplicación, productividad máxima bajo condiciones de suficiencia de nitrógeno y limitación de nitrógeno

a.1) Graficar los datos de biomasa bajo condiciones de suficiencia nutricional y determinar la zona de crecimiento exponencial (figura 4.7)

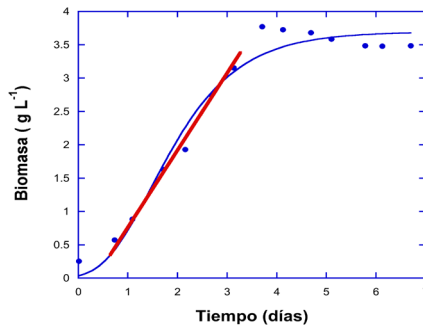


Figura 4.7. Crecimiento microalgal bajo suficiencia nutricional.

a.2) Calcular con la fórmula expresada en la ecuación (4.25), la velocidad de crecimiento para los casos con suficiencia nutricional

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t - t_o} = \frac{\ln(3.77) - \ln(0.574)}{(3.704 - 0.731)} = 0.633d^{-1} \quad (4.32)$$

a.3) Calcular el tiempo de duplicación con la ecuación (4.26)

$$t_d = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} = \frac{0.693}{0.633} = 1.09 \text{ d} \quad (4.33)$$

a.4) Calcular la productividad de biomasa usando la ecuación (4.27)

$$P = \frac{X_t - X_o}{t - t_o} = \frac{3.77 - 0.574}{3.704 - 0.731} = 1.08 \frac{\text{g}_X}{\text{L d}} \quad (4.34)$$

a.5) Hacer lo mismo que en el inciso a.1), pero ahora con los datos de limitación de nitrógeno (figura 4.8)

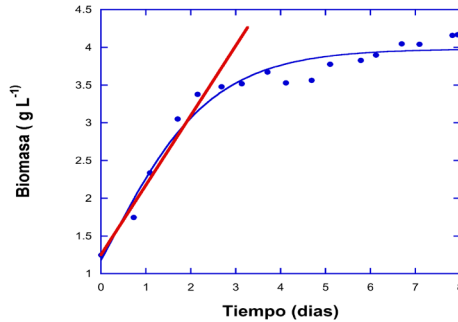


Figura 4.8. Crecimiento microalgal bajo limitación de nitrógeno.

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_t - \text{Ln } X_o}{t - t_o} = \frac{\text{Ln}(3.379) - \text{Ln}(1.247)}{(2.152 - 0.009)} = 0.47 \text{ d}^{-1} \quad (4.35)$$

$$t_d = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} = \frac{0.693}{0.633} = 1.49 \text{ d} \quad (4.36)$$

$$P = \frac{X_t - X_o}{t - t_o} = \frac{3.77 - 0.574}{3.704 - 0.731} = 0.99 \frac{\text{g}_X}{\text{L d}} \quad (4.37)$$

b) Calcular la capacidad de captura de CO_2 . Se ha determinado mediante análisis elemental de CHONS que el contenido de carbono de la biomasa microalgal es de 48% para el caso de crecimiento con suficiencia nutricional.

b.1) Usar la ecuación (4.29) para calcular la tasa de fijación de CO_2

En esta ecuación, C_c tiene un valor de 0.48, P será el valor calculado en el inciso a.4), así como los pesos moleculares de CO_2 y del carbono.

$$P_{\text{CO}_2} = C_c \cdot P \left(\frac{M_{\text{CO}_2}}{M_c} \right) = 0.48 \frac{\text{g}_c}{\text{g}_x} \left(1.08 \frac{\text{g}_x}{\text{L d}} \right) \left(\frac{44 \frac{\text{g}}{\text{g-mol}}}{12 \frac{\text{g}}{\text{g-mol}}} \right) = 1.90 \frac{\text{g}_c}{\text{L d}} \quad (4.38)$$

c) Determinar la productividad lipídica

c.1) Usar la ecuación (4.28) para determinar la productividad lipídica

Para ello utilizar la información de los datos de: la tasa de crecimiento, la concentración de biomasa y la fracción de lípidos en la biomasa microalgal; para determinar la productividad lipídica.

$$P_{\text{Lip}} = \mu \cdot L \cdot X = \left(0.47 \frac{1}{\text{d}} \right) \left(0.175 \frac{\text{g}_L}{\text{g}_x} \right) \left(3.379 \frac{\text{g}_x}{\text{L}} \right) = 0.274 \frac{\text{g}_L}{\text{L d}} \quad (4.39)$$

d) Calcular la eficiencia fotosintética del sistema de cultivo bajo condiciones de suficiencia nutricional y bajo limitación de nitrógeno

d.1) Hacer uso de la ecuación (4.31) para calcular la eficiencia fotosintética en el caso de suficiencia nutricional

$$PE = \left(\frac{X_t \cdot V \cdot \Delta H \cdot E_N}{E \cdot A \cdot I_t} \right) 100 = \left[\frac{\left(3.486 \frac{\text{g}_X}{\text{L}} - 0.256 \frac{\text{g}_X}{\text{L}} \right) (1.8 \text{L}) \left(20.6 \frac{\text{KJ}}{\text{g}_X} \right) (1.25)}{\left(210 \frac{\text{KJ}}{\text{mol}_{\text{fotones}}} \right) (0.09 \text{ m}^2) \left(300 \frac{\mu\text{mol}_{\text{fotones}}}{\text{m}^2 \text{ s}} \left(\frac{1 \text{ mol}_{\text{fotones}}}{10^6 \mu\text{mol}_{\text{fotones}}} \cdot \frac{3600 \text{ s}}{1 \text{ h}} \cdot \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ d}} \right) \right) (6.698 \text{d} - 0.009 \text{d})} \right] 100 = 6.33\%$$

(4.40)

d.2) Hacer uso de la ecuación (4.31) para calcular la eficiencia fotosintética en el caso de limitación de nitrógeno

$$PE = \left(\frac{X_t \cdot V \cdot \Delta H \cdot E_N}{E \cdot A \cdot I_t} \right) 100 = \left[\frac{\left(4.168 \frac{\text{g}_X}{\text{L}} - 1.247 \frac{\text{g}_X}{\text{L}} \right) (1.8 \text{L}) \left(26.7 \frac{\text{KJ}}{\text{g}_X} \right) (1.25)}{\left(210 \frac{\text{KJ}}{\text{mol}_{\text{fotones}}} \right) (0.09 \text{ m}^2) \left(200 \frac{\mu\text{mol}_{\text{fotones}}}{\text{m}^2 \text{ s}} \left(\frac{1 \text{ mol}_{\text{fotones}}}{10^6 \mu\text{mol}_{\text{fotones}}} \cdot \frac{3600 \text{ s}}{1 \text{ h}} \cdot \frac{24 \text{ h}}{1 \text{ d}} \right) \right) (7.039 \text{d} - 0.009 \text{d})} \right] 100 = 9.38\%$$

(4.41)

Problema 4.4 Obtención de biocombustibles a partir de biomasa microalgal. Caso de estudio producción de biogás

Marco teórico

Las microalgas son una fuente potencial de materias primas (sustratos) para la obtención de biocombustibles; de acuerdo a las condiciones del cultivo (aspectos nutricionales o ambientales), la biomasa microalgal pueden proveer altos niveles de compuestos de carbono. Estos se pueden encontrar disponibles o requerir de un pretratamiento para la liberación de los compuestos de interés.

Los ácidos grasos de las microalgas pueden alcanzar niveles entre 20-80%, bajo ciertas condiciones de estrés nutricional y de cultivo. A partir de ellos se puede producir el biodiesel, el cual es: un combustible renovable, biodegradable, no tóxico y ambientalmente amigable. Este biocombustible tiene la ventaja de que: emite 78% menos CO₂, 98% menos azufre y 50% menos emisiones de partículas (Brown & Zeiler, 1993). El biodiesel típicamente consiste de: una mezcla de ácidos alquil ésteres obtenidos de la transesterificación de aceites o grasas, que están compuestos entre un 90-98% de triacilglicéridos, con niveles mucho menores de monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y cantidades residuales de fosfolípidos.

La producción de **etanol** de la biomasa microalgal se puede obtener por la vía de la fermentación de almidón, azúcares simples y celulosa. En el caso de las microalgas, el contenido de carbohidratos varía entre un 70-72% siendo el almidón la biomolécula que domina y dependiendo de las condiciones de cultivo puede llegar a constituir un 60% en peso. Por lo tanto, la producción de etanol puede hacerse de la fermentación directa de la biomasa microalgal, o de los residuos biomasa generados del proceso de extracción y producción de lípidos para de esta manera reciclar residuos, reintegrando al cultivo de microalgas el CO₂ generado, además la celulosa no fermentable puede usarse como suplemento para alimento animal.

La producción del **hidrógeno** se considera una opción de gran relevancia por su carácter limpio, libre de contaminación. Bajo condiciones anaeróbicas, las microalgas pueden producir H₂, a través de la fotólisis directa o indirecta del agua, utilizando a la luz solar como fuente de energía. Esta reacción es catalizada por la hidrogenasa, una enzima extremada-

mente sensible al oxígeno, un sub-producto de la fotosíntesis. Debido a que las microalgas pueden cultivarse en sistemas cerrados, el H_2 generado puede capturarse. Este gas es el único combustible que producen las microalgas de manera directa.

El **biogás** es una mezcla de gases entre los que se encuentran el CH_4 , con CO_2 en mayor proporción; además de otros compuestos como H_2S y NH_3 ; es también el producto de la digestión anaerobia de la materia orgánica y puede obtenerse a partir de la biomasa de las microalgas. Con base en los componentes bioquímicos más abundantes en la biomasa microalgal y a partir de su composición elemental se pueden estimar los rendimientos teóricos (Sialve, Bernet et al, 2009). La digestión anaerobia puede eliminar o reducir los costos asociados a la cosecha y secado de la biomasa microalgal, necesarios en la producción de otros combustibles como el biodiesel.

Finalmente, pueden obtenerse otros combustibles, si el procesamiento de esa biomasa se hace por medio de tratamientos térmicos (altas temperaturas y presiones). A través de gasificación puede generarse el gas de síntesis que mediante procesos de polimerización produce: gasolina, nafta, keroseno y diésel. Y por procesos de pirólisis y licuefacción hidrotérmica puede obtenerse el bio-crudo o bio-petróleo, que puede refinarse como el petróleo de origen mineral para obtener diferentes combustibles.

Enunciado del problema

La composición de la biomasa microalgal (tabla 4.20) es altamente dependiente de la especie y de las condiciones de cultivo. Ésta puede tener proporciones de proteínas (6-52%), lípidos (7-23%) y carbohidratos (5-23%); además de los mayores componentes en la biomasa de las microalgas (carbono, nitrógeno, fósforo), también pueden encontrarse oligonutrientes (hierro, cobalto, zinc); que se sabe estimulan la metanogénesis. La biomasa microalgal puede utilizarse para la producción de biogás, ya sea procesando directamente la biomasa cruda, o la residual proveniente de la extracción de lípidos o carbohidratos requeridos en la producción de biodiesel o etanol. Lo anterior, genera un aprovechamiento integral de la biomasa microalgal en un marco de obtención de biocombustibles, permitiendo la recuperación de energía y reciclando corrientes. A pesar de que la idea de producción de biogás a partir de la biomasa microalgal surgió en la década de los cincuenta del siglo pasado, recientemente Sialve *et al.*, 2009, retomaron esa investigación, siendo hasta a la fecha motivo de estudio por parte de diversos grupos que trabajan en la producción de biocombustibles de la biomasa microalgal.

Actividades

- i. Deduzca una expresión estequiométrica que represente la digestión anaerobia de la materia orgánica ($C_aH_bO_cN_d$), donde los productos de la reacción sean únicamente CH_4 , CO_2 y NH_3 . Esta expresión permitirá calcular eventualmente el potencial máximo de generación de metano.
- ii. Determine el potencial de generación de metano ($L_{CH_4} g_{SV}$) de los organismos fotosintéticos presentados en la tabla 4.1.18, de los cuales se ha caracterizado el perbioquímico: proteínas ($C_6H_{13.1}ON_{0.6}$), lípidos ($C_{57}H_{104}O_6$), carbohidratos ($C_6H_{10}O_5$)_n.

Tabla 4.20. Composición de la biomasa de diferentes especies en cuanto a proteínas, carbohidratos y lípidos. Adaptado de Morales *Et al.*, 2015.

Microalga	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
<i>Anabaena cylindrical</i>	56	30	7
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	36	27	15
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	58	17	22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	61	18	20
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10	40	41
<i>Porphyridium cruentum</i>	28	57	14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	56	17	14
<i>Spirogyra sp.</i>	20	64	11
<i>Spirulina platensis</i>	63	14	9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8	52	40
<i>Spirulina maxima</i>	71	16	7
<i>Scenedesmus obtusiusculus*</i>	11	28	56
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8	52	40

Solución (para detalles ver la hoja Excel titulada Problema 3)

a) Deduzca una expresión estequiométrica que represente la digestión anaerobia de la materia orgánica ($C_aH_bO_cN_d$), donde los productos de la reacción sean únicamente CH_4 , CO_2 y NH_3 .

a.1) Identificar los reactivos y productos, así como los coeficientes a utilizarse en la ecuación estequiométrica



a.2) Plantear los balances elementales

$$\text{Balance de carbono: } a = f + g \quad (4.43)$$

$$\text{Balance de hidrógeno: } b + 2e = 4f + 3h \quad (4.44)$$

$$\text{Balance oxígeno: } c + e = 2g \quad (4.45)$$

$$\text{Balance de nitrógeno: } d = h \quad (4.46)$$

Se tienen 8 incógnitas, aunque en realidad son 7 ya que $d=h$, simplificando tenemos que:



a.3) Deducir las expresiones para los coeficientes e, f y g

Despejando $2e$ de la ecuación (4.44) resulta:

$$2e = 4f + 3d - b \quad (4.48)$$

Despejando f de la ecuación (4.43) se tiene que:

$$f = a - g \quad (4.49)$$

y despejando g de la ecuación (4.45):

$$g = (c + e) / 2 \quad (4.50)$$

Sustituyendo (4.50) en (4.49):

$$f = a - (c + e) / 2 \quad (4.51)$$

Finalmente, sustituyendo (4.51) en (4.48) se llega a:

$$2e = 4a - 2c - 2e + 3d - b \quad (4.52)$$

Reagrupando términos:

$$4e = 4a - b - 2c + 3d \quad (4.53)$$

y, finalmente, despejando e se llega a:

$$e = \left(\frac{4a - b - 2c + 3d}{4} \right) \quad (4.54)$$

Partiendo de la ecuación (4.51) y reordenándola se llega a:

$$2f = 2a - c - e \quad (4.55)$$

Sustituyendo el valor de e (ecuación 4.54) en la ecuación (4.55) se llega a:

$$2f = 2a - c - \left(\frac{4a - b - 2c + 3d}{4} \right) \quad (4.56)$$

Haciendo la fracción común se llega a:

$$2f = \left(\frac{8a - 4c - 4a + b + 2c - 3d}{4} \right) \quad (4.57)$$

Realizando las operaciones indicadas en (4.57) se llega a:

$$2f = \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{4} \right) \quad (4.58)$$

despejando f, se llega a la siguiente expresión que permite calcular el coeficiente asociado al metano:

$$f = \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{8} \right) \quad (4.59)$$

Finalmente, se calcula g a partir de la ecuación (4.49):

$$g = a - f \quad (4.60)$$

Sustituyendo el valor de f (ecuación 4.59), en la ecuación (4.60) se llega a:

$$g = a - \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{8} \right) \quad (4.61)$$

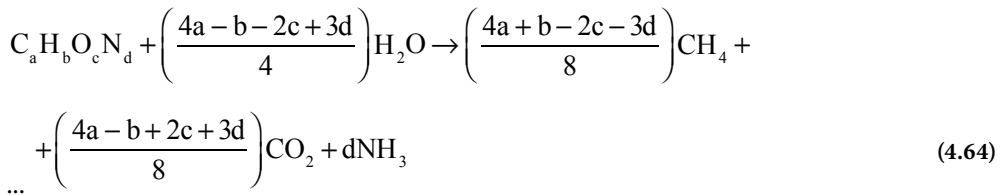
Realizando la fracción común de la expresión anterior se obtiene:

$$g = \left(\frac{8a - 4a - b + 2c + 3d}{8} \right) \quad (4.62)$$

Para finalmente, llegar a:

$$g = \left(\frac{4a - b + 2c + 3d}{8} \right) \quad (4.63)$$

a.4) Determinar la expresión estequiométrica sustituyendo las anteriores en la ecuación original



a.5) Deducir la expresión para calcular el potencial de degradación de metano o rendimiento de la biomasa hacia metano.

$$\frac{\text{mol de } CH_4}{\text{g biomasa}} = \frac{\left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{8} \right)}{C_a H_b O_c N_d} = \frac{1}{8} \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{12a + b + 16c + 14d} \right) \quad (4.65)$$

Si se cuenta con el volumen molar (V_m) del CH_4 se llega a:

$$\frac{L \text{ de } CH_4}{\text{g biomasa}} = \frac{1}{8} \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{12a + b + 16c + 14d} \right) V_m \quad (4.66)$$

b) Determine el potencial de generación de metano ($L_{CH_4} g_{SV}$) de los organismos fotosintéticos (tabla 4.22) de los cuales se ha caracterizado el perfil bioquímico: proteínas ($C_6H_{13.1}ON_{0.6}$), lípidos ($C_{57}H_{104}O_6$), carbohidratos ($C_6H_{10}O_5$)_n.

b.1) Calcular el potencial de generación de CH_4 para proteínas, carbohidratos y lípidos

Hacer uso de su fórmula general para: proteínas, carbohidratos y lípidos; así como la expresión deducida anteriormente, recordando que bajo condiciones estándar 1 mol de cualquier gas ocupa 22.4 L (tabla 4.21).

Tabla 4.21. Potencial metanogénico de proteínas, lípidos y carbohidratos.

	Fórmula	a	b	c	d	$\frac{L \text{ de } CH_4}{g \text{ biomasa}} = \frac{1}{8} \left(\frac{4a + b - 2c - 3d}{12a + b + 16c + 14d} \right) 22.4$
Proteínas	$C_6H_{13.1}ON_{0.6}$	6	13.1	1	0.6	$0.8515 L_{CH_4} g_{proteínas}^{-1}$
Lípidos	$(C_6H_{10}O_5)_n$	57	104	6	0	$1.0136 L_{CH_4} g_{lípidos}^{-1}$
Carbohidratos	$C_{57}H_{104}O_6$	6	10	5	0	$0.4148 L_{CH_4} g_{proteínas}^{-1}$

b.2) Calcular el potencial metanogénico de los microorganismos

Hacer uso de la información de la tabla 4.20, así como de los valores del potencial metanogénico que se calcularon y presentan en la tabla 4.21. Considerando que los porcentajes están referidos a gramos de biomasa seca (tabla 4.22).

Tabla 4.22. Potencial metanogénico las diferentes microalgas.

Microalga	Proteínas (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	$\frac{L \text{ de CH}_4}{g \text{ biomasa}}$
<i>Anabaena cylindrical</i>	56	30	7	0.67
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	36	27	15	0.57
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	0.69
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	0.61
<i>Chlorella vulgaris</i>	58	17	22	0.78
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	0.68
<i>Euglena gracilis</i>	61	18	20	0.79
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10	40	41	0.66
<i>Porphyridium cruentum</i>	28	57	14	0.61
<i>Scenedesmus obliquus</i>	56	17	14	0.69
<i>Spirogyra sp.</i>	20	64	11	0.54
<i>Spirulina platensis</i>	63	14	9	0.68
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	0.71
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8	52	40	0.68
<i>Spirulina maxima</i>	71	16	7	0.74
<i>Scenedesmus obtusiusculus*</i>	11	28	56	0.77
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8	52	40	0.68

En la última columna se reportan los valores del potencial metanogénico de las diferentes microalgas.

Problema 4.5 Diseño de un sistema a base de microalgas-bacterias para depuración de biogás

Marco teórico

En el contexto tecnológico actual, es necesaria la eliminación de los principales contaminantes del biogás (H_2S y CO_2), para una mejor combustión sin que haya problemas de corrosión ocasionados por el H_2S , o la reducción del poder calorífico del mismo por la presencia de CO_2 . El nivel de remoción de contaminantes o depende del uso que se le vaya a dar a ese biogás, ya sea como agente de combustión para generar energía térmica o eléctrica; o su incorporación a las líneas de gas natural. En muchos países, los niveles de CO_2 y H_2S para la inyección de biogás en la red están establecidos por ley en: $< 2\text{-}3\%$ y $< 5\text{-}15 \text{ mg S m}^{-3}$, respectivamente. Actualmente la limpieza de este biocombustible se lleva a cabo de forma separada, a menudo mediante tecnologías físico-químicas, que conllevan elevados costos de operación poniendo en riesgo la viabilidad económica del proceso. Así, la eliminación de CO_2 se lleva a cabo en la actualidad mediante procesos energéticamente muy intensivos; que a menudo requieren una eliminación previa del H_2S por torres de lavado a presión (con y sin adición de reactivos químicos), procesos de adsorción-desorción (PSAD) o criogénicos. Del mismo modo, la eliminación de H_2S se realiza mediante procesos físico-químicos que conllevan altos costos de operación; a diferencia de lo anterior, los procesos biológicos de oxidación de H_2S (basados en la introducción de O_2 puro o aire al biogás) contaminan el biogás con O_2 y N_2 ($\text{N}_2 < 7$), y no son capaces de eliminar el CO_2 del biogás.

Desafortunadamente, no existen al día de hoy, tecnologías capaces de eliminar simultáneamente CO_2 y H_2S del biogás de una forma económica y medioambientalmente sostenible, para: obtener un biometano de alta calidad capaz de ser inyectado en redes de gas natural o usado directamente como combustible en vehículos.

Por otro lado, se puede aprovechar la simbiosis que se puede presentar entre microalgas y bacterias heterótrofas/quimioautótrofas en fotobiorreactores. Esto representa una plataforma tecnológica para eliminar simultáneamente el CO_2 y H_2S del biogás, sin contaminación de este por O_2 o N_2 . En estos sistemas, las microalgas usan la energía proveniente de la luz solar para fijar el CO_2 del biogás vía fotosíntesis con la consiguiente generación de oxígeno. El oxígeno producido *in-situ* será empleado por bacterias quimioautótrofas para

la oxidación de H_2S a sulfato, lo que evita los problemas de operación derivados del tapo-namiento del lecho por acumulación de azufre elemental, que se presenta en tecnologías convencionales de eliminación de H_2S (por ejemplo, biofiltros o biofiltros percoladores), y la contaminación por O_2 en el biogás tratado. En esta conceptualización, se pueden emplear los nutrientes de digestores anaerobios que producen el biogás, para soportar el crecimiento de microalgas con potencial de usarse; las cuales pueden utilizarse como biofertilizante de lenta liberación por su contenido de nitrógeno, fósforo y fitohormonas. En la actualidad, esta tecnología se implementa en un sistema formado por una columna de absorción de biogás interconectada con un fotobiorreactor de lagunaje de alta carga tipo HRAP (figura 4.9).

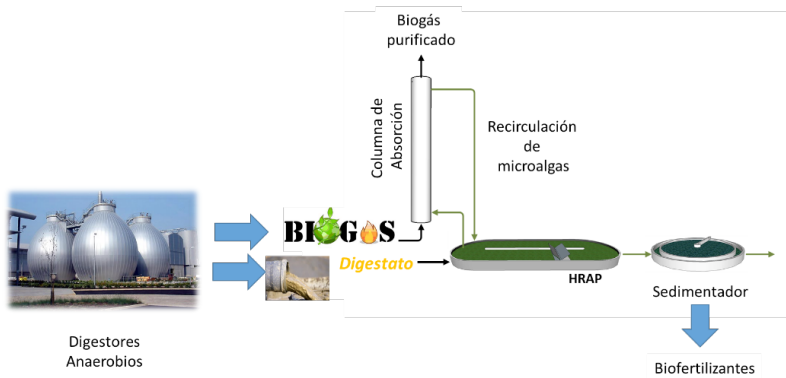


Figura 4.9. Esquema del proceso de purificación de biogás.

La potencia necesaria para bombear el caldo de cultivo del fotobiorreactor a la columna de absorción puede estimarse como:

$$P(W) = Q \cdot \rho \cdot h \cdot g \quad (4.67)$$

Donde:

- Q es el caudal del caldo de cultivo que se recircula por la columna (m^3/s);
- g es la aceleración de la gravedad (m/s^2);
- h la altura de bombeo del líquido (m);
- ρ es la densidad del caldo de cultivo (kg/m^3);

Por otro lado, la energía de compresión del biogás para su bombeo en la torre de burbujeo se puede estimar como:

$$P(W) = \frac{Q \cdot \Delta P}{\text{Eficacia del compresor}} \quad (4.68)$$

Donde:

Q es el caudal de biogás ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$);

ΔP la pérdida de carga (Pa);

La eficacia del compresor que es de alrededor de 0.7.

Enunciado del problema

El proceso de limpieza de biogás se muestra en la figura 4.10, con el cual se desea tratar una corriente de biogás de $38 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ($T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ y $P = 1 \text{ atm}$); cuya relación de $\text{CH}_4:\text{CO}_2:\text{H}_2\text{S}$ es 64.5:35:0.5, respectivamente.

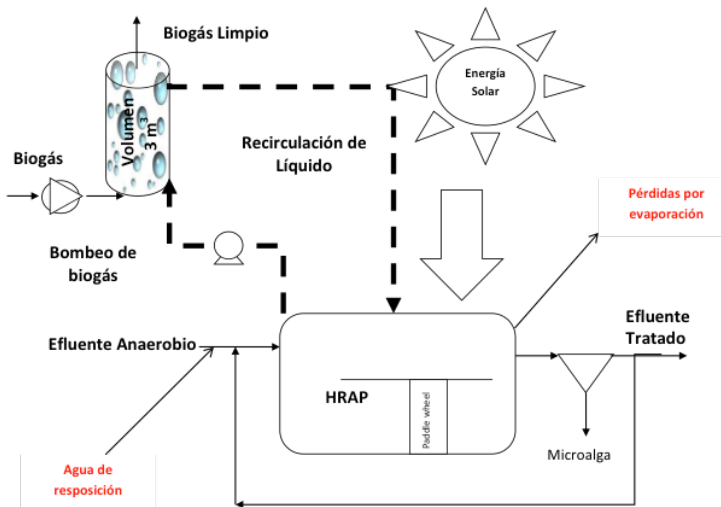


Figura 4.10. Diagrama del proceso de depuración de biogás.

Para este diseño se puede asumir una composición de la biomasa algal de: $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$, una productividad de biomasa de $15 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$, y un área de fotobiorreactor de lagunaje (HRAP) de $1\,000 \text{ m}^2$ (0.3 m profundidad) cuyo mezclado del HRAP se realiza a una velocidad de 20 cm s^{-1} , lo cual conlleva un consumo energético de 2.5 W m^{-3} . El HRAP se encuentra interconectado a una columna de burbujeo de 3 m^3 (2 m de altura), con una velocidad de recirculación externa del caldo de cultivo del fotobiorreactor de $82 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$. El proceso se alimenta con un digestato anaerobio procedente de un digestor de tratamiento de residuos sólidos; que contiene: $3800 \text{ mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, $600 \text{ mgP-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ y 6000 mg carbono inorgánico L^{-1} . Las pérdidas de agua por evaporación bajo las condiciones climáticas de México se estiman en $6 \text{ L m}^2 \text{ d}^{-1}$. La biomasa producida se recoge mediante un proceso de sedimentación, donde $10 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ de agua del sobrenadante se devuelve al HRAP para mantener una concentración de biomasa algal de 1.5 g L^{-1} . Para el cálculo de la eficiencia fotosintética, asumir un calor específico de la biomasa microalgal de 21 kJ g^{-1} y una irradiación media diaria de 200 W m^{-2} . Adicionalmente, se sabe que en este esquema de procesamiento se logra una eliminación de CO_2 y H_2S de 90% y 100%, respectivamente.

Calcular:

- i. La composición (%) y flujo del biogás a la salida de la columna de absorción (L d^{-1}).
- ii. Flujo volumétrico (L d^{-1}) de efluente anaerobio, para satisfacer la producción de microalgas derivada de la limpieza del biogás y determinar el componente limitante.
- iii. El flujo de agua de reposición (L d^{-1}).
- iv. Estimar el consumo energético diario (kW h) del suministro de gas, recirculación interna y externa.

Solución

a) Calcular la composición (%) y flujo del biogás a la salida de la columna de absorción (L d^{-1})

a.1) Estimar el flujo molar total a partir del flujo volumétrico global, usando la ecuación de los gases ideales

$$PV = nRT \tag{4.69}$$

$$n = \frac{PV}{RT} = \frac{1 \text{ atm } 38000 \frac{\text{L}}{\text{d}}}{0.0821 \frac{\text{atm L}}{\text{mol K}} (35 + 273.3) \text{ K}} = 1505 \frac{\text{mol}}{\text{d}} \tag{4.70}$$

a.2) Calcular el flujo molar de cada uno de los componentes de la corriente a tratar

Multiplicar el flujo global, por el porcentaje molar de cada componente individual en el biogás: CH₄ (64.5%), CO₂ (35%) y H₂S (0.5%)

Flujo molar a la entrada de CH₄:

$$1505 \frac{\text{mol}}{d} \left(\frac{64.5}{100} \right) = 970 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.71)$$

Flujo molar a la entrada de CO₂:

$$1505 \frac{\text{mol}}{d} \left(\frac{35}{100} \right) = 527 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.72)$$

Flujo molar a la entrada de H₂S:

$$1505 \frac{\text{mol}}{d} \left(\frac{0.5}{100} \right) = 7.5 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.73)$$

a.3) Determinar la composición de la corriente a la salida

Se calcula a partir de los porcentajes de remoción que se logran en la columna de absorción: el 90% del CO₂ y el 100% de H₂S.

Flujo molar a la salida de CH₄ sin eliminación:

$$1505 \frac{\text{mol}}{d} \left(\frac{64.5}{100} \right) = 970 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.74)$$

Flujo molar a la salida de CO₂ con 90% de remoción:

$$527 \frac{\text{mol}}{d} (1 - 0.9) = 52.7 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.75)$$

Flujo molar a la salida de H₂S, con 100% de remoción:

$$7.5 \frac{\text{mol}}{d} (1 - 1) = 0 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.76)$$

a.4) Calcular el flujo molar total

El flujo molar total (suma de los flujos molares anteriores para CH₄ y CO₂) y los flujos molares individuales:

Flujo molar total:

$$(970 + 52.7) \frac{\text{mol}}{d} = 1022.7 \frac{\text{mol}}{d} \quad (4.77)$$

a.5) Calcular la composición en porcentaje de la corriente

Se sabe que la fracción molar es igual a la fracción volumétrica, además teniendo los flujos molares para cada especie y el flujo molar total se tiene que:

Porcentaje de CH₄ a la salida:

$$\frac{970 \frac{\text{mol}}{d}}{1022.7 \frac{\text{mol}}{d}} (100) = 94.85\% \quad (4.78)$$

Porcentaje de CO₂ a la salida:

$$\frac{52.7 \frac{\text{mol}}{d}}{1022.7 \frac{\text{mol}}{d}} (100) = 5.15\% \quad (4.79)$$

a.6) Calcular el flujo volumétrico de biogás tratado a 35 °C y 1 atm

Este flujo se puede estimar a partir de la ecuación de estado de los gases ideales y del flujo molar total de la corriente de salida (suma de los flujos molares anteriores).

$$V = \frac{n \cdot R \cdot T}{P} = \frac{(970 + 52.7) \frac{\text{mol}}{d} \cdot 0.0821 \frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol} \cdot \text{K}}}{1 \text{ atm}} = 25829 \frac{\text{L}}{d} \quad (4.80)$$

b) Calcular el flujo volumétrico ($L d^{-1}$) de efluente anaerobio, para satisfacer la producción de microalgas derivada de la limpieza del biogás y determinar el componente limitante

b.1) Calcular la producción diaria de microalgas

Hacer uso de los datos de productividad de biomasa microalgal y el área del HRAP.

$$15 \frac{g}{m^2 d} 1000 m^2 = 15000 \frac{g}{d} = 15 \frac{Kg}{d} \quad (4.81)$$

b.2) Determinar la fracción o porcentaje másico de la biomasa microalgal

Se calcula a partir de la fórmula estequiométrica de la biomasa algal $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ y el peso molecular de esta (tabla 4.23). Peso molecular de la biomasa es $2428 g gmol^{-1}$.

Tabla 4.23. Cálculo del peso molecular de la biomasa microalgal.

Elemento químico	Peso atómico	Número de átomos	Masa
C	12	106	1272
H	1	181	181
O	16	45	720
N	14	16	224
P	31	1	31
Biomasa			2428 $g gmol^{-1}$

El porcentaje de carbono en la biomasa es:

$$\frac{1272}{2428}(100) = 52.4\% \quad (4.82)$$

El porcentaje de nitrógeno en la biomasa es:

$$\frac{224}{2428}(100) = 9.2\% \quad (4.83)$$

El porcentaje de fósforo en la biomasa es:

$$\frac{31}{2428}(100) = 1.3\% \quad (4.84)$$

b.3) Calcular la cantidad necesaria de C, N y P

Multiplicar la producción diaria de microalgas (ver inciso b.1) por el contenido de cada componente (en fracción másica).

La masa de carbono requerida es:

$$15000 \frac{\text{g}}{\text{d}}(0.524) = 7860 \frac{\text{g}_C}{\text{d}} \quad (4.85)$$

La masa de nitrógeno a suministrarse es:

$$15000 \frac{\text{g}}{\text{d}}(0.092) = 1380 \frac{\text{g}_N}{\text{d}} \quad (4.86)$$

La masa de fósforo necesaria es:

$$15000 \frac{\text{g}}{\text{d}}(0.013) = 195 \frac{\text{g}_P}{\text{d}} \quad (4.87)$$

b.4) Calcular el flujo necesario del digestato para suministrar el nitrógeno y el fósforo necesarios para el desarrollo de la microalga

Lo cual se hace a partir del suministro necesario, calculado en el inciso b.2), para el nitrógeno; así como del dato del contenido de este elemento en el digestato.

$$F_{N-\text{digestato}} = \frac{1380 \frac{\text{g}_N}{\text{d}}}{3.8 \frac{\text{g}_N}{\text{L}}} = 363.16 \frac{\text{L}}{\text{d}} \quad (4.88)$$

Del mismo modo, el flujo de digestato para suministrar todo el P se calcula a partir del contenido y del flujo másico de este en el efluente; como:

$$F_{P-\text{digestato}} = \frac{195 \frac{\text{g}_P}{\text{d}}}{0.6 \frac{\text{g}_P}{\text{L}}} = 325 \frac{\text{L}}{\text{d}} \quad (4.89)$$

Por otro lado, el carbono suministrado por la eliminación del 90% del CO₂ del biogás equivale a:

$$\left(527 \frac{\text{mol}_{\text{CO}_2}}{d} - 52.7 \frac{\text{mol}_{\text{CO}_2}}{d} \right) \left(\frac{12 \text{ g}_C}{\text{mol}_{\text{CO}_2}} \right) = 5692 \frac{\text{g}_C}{d} \quad (4.90)$$

Y a partir del cálculo del carbono requerido estimado en b3), y de lo que se suministra en el biogás; se puede determinar la cantidad de carbono inorgánico con que se deberá alimentar el digestato:

$$\left(7860 \frac{\text{g}_C}{d} - 5692 \frac{\text{g}_C}{d} \right) = 2168 \frac{\text{g}_C}{d} \quad (4.91)$$

De esta manera, el flujo de digestato para suministrar todo el carbono necesario se calcula a partir del contenido de carbono tanto en el efluente como en el flujo másico que se requiere suministrar, finalmente se tiene que:

$$F_{C\text{-digestato}} = \frac{2168 \frac{\text{g}}{d}}{6 \frac{\text{g}}{L}} = 361 \frac{L}{d} \quad (4.92)$$

Por lo tanto, sería necesario un flujo de efluente anaerobio de 363 L d⁻¹, (siendo el nitrógeno el elemento limitante) para mantener la productividad algal deseada.

c) Estimar el flujo de agua de reposición (L d⁻¹)

c.1) Calcular el flujo de agua de reposición a partir del dato de las pérdidas por evaporación

Se considera que el efluente de salida tiene el mismo flujo que el efluente anaerobio de entrada al HRAP.

$$\left(6 \frac{L}{m^2 d} \right) (1000 m^2) = 6000 \frac{L}{d} \quad (4.93)$$

El valor anterior corresponde a la huella hidráulica del sistema.

d) Estimar el consumo energético diario (kWh) del suministro de gas, recirculación interna y externa.

d.1) Calcular el consumo de energía de bombeo de biogás

Para estimar el consumo de energía de bombeo de biogás se aplica la siguiente expresión:

$$P(W) = \frac{Q \cdot \Delta P}{0.7} = \frac{\left(38 \frac{m^3}{d}\right) \left(\frac{1d}{24h}\right) \left(\frac{1h}{60min}\right) \left(\frac{1min}{60s}\right) (2m_{H_2O}) \left(\frac{1 atm}{10.33m_{H_2O}}\right) \left(\frac{10 1325 Pa}{1 atm}\right)}{0.7} \quad (4.94)$$

$$P(W) = 12.35 \left(\frac{Pa m^3}{s}\right) \left(\frac{Nm^{-2}}{1Pa}\right) \left(\frac{1Joule}{1 Nm}\right) \left(\frac{W}{1 Joule s^{-1}}\right) = 12.35 W \quad (4.95)$$

Por lo que en un día se consumirían:

$$12.35 W (24 h) = 296.4 Wh \left(\frac{1kWh}{1 000 Wh}\right) = 0.296 kWh \quad (4.96)$$

d.2) Calcular el consumo de energía de bombeo del caldo de cultivo

Para estimar el consumo de energía del bombeo de caldo de cultivo a la torre, se aplica la siguiente expresión:

$$P(W) = Q \cdot \rho \cdot h \cdot g = 82 \frac{m^3}{d} \left(\frac{1 d}{24h}\right) \left(\frac{1 h}{3 600s}\right) \left(1 000 \frac{kg}{m^3}\right) (2m_{H_2O}) \left(9.8 \frac{m}{s^2}\right) \quad (4.97)$$

$$P(W) = 18.6 \frac{kgm^2}{s^3} = 18.6 \frac{Joule}{s} = 18.6 W \quad (4.98)$$

Por lo que en un día se consumirían:

$$18.6 W (24 h) = 446.4 Wh \left(\frac{1kWh}{1 000 Wh}\right) = 0.446 kWh \quad (4.99)$$

d.3) Calcular el consumo de energía para agitación del caldo de cultivo

Por último, para estimar el consumo de energía que se necesita para mantener el cultivo algal agitado, se tiene que tomar en cuenta el volumen de HRAP y el consumo energético volumétrico:

$$P(W) = \text{Área} \cdot \text{profundidad} \cdot \text{consumo energético volumétrico} \quad (4.100)$$

$$P(W) = 1000 \text{ m}^2 (0.3 \text{ m}) \left(2.5 \frac{W}{\text{m}^3} \right) = 750 \text{ W} \quad (4.101)$$

Por lo que en un día se consumirían:

$$750 \text{ W} (24 \text{ h}) = 18000 \text{ Wh} \left(\frac{1 \text{ kWh}}{1000 \text{ Wh}} \right) = 18 \text{ kWh} \quad (4.102)$$

Nomenclatura

A	Área iluminada (m^2)
C_c	Fracción de carbono en la biomasa ($g_{\text{carbono}} g^{-1}$)
C_{lip}	Concentración de lípidos ($g_{\text{lípidos}} L^{-1}$)
ΔH	Calor de combustión de la biomasa microalgal ($KJ g^{-1}$)
ΔP	Pérdida de carga (Pa)
E	Energía contenida en la radiación fotosintéticamente activa (PAR) con un valor de $210 KJ mol_{\text{fotones}}^{-1}$
E_a	Energía de activación ($cal mol^{-1}$)
E_d	Energía de desactivación ($cal mol^{-1}$)
E_N	Coefficiente de asimilación de nitratos (1.25)
g	Aceleración de la gravedad ($m s^{-2}$)
h	Altura de bombeo de la columna de agua (m_{H_2O})
I	Irradiancia ($mol_{\text{fotones}} m^{-2} s^{-1}$)
I_o	Irradiancia en la superficie ($mol_{\text{fotones}} m^{-2} s^{-1}$)
I_r	Irradiancia a una distancia r ($mol_{\text{fotones}} m^{-2} s^{-1}$)
I_t	Irradiancia que llega en un periodo determinado ($mol_{\text{fotones}} m^{-2} s^{-1}$)
K_a	Coefficiente de absorción de la luz ($m^2 g_x^{-1}$)
k_o	Factor de frecuencia en la ecuación de Arrhenius
K_s	Constante de saturación en cinética tipo Monod donde se considera que I es el sustrato limitante ($mol m^{-2} s^{-1}$)
L	Fracción de lípidos en la biomasa ($g_{\text{lípidos}} g_X$)
M_c	Peso molecular del carbono ($g gmol^{-1}$)
M_{CO_2}	Peso molecular del CO_2 ($g gmol^{-1}$)
μ	Tasa de crecimiento específico (d^{-1})
P	Productividad de biomasa ($g L^{-1} d^{-1}$)

PE	Eficiencia fotosintética (%)
P_{CO_2}	Tasa de fijación de CO_2 ($g_{CO_2} L^{-1} d^{-1}$)
P_{Lip}	Productividad lipídica ($g_{lipidos} L^{-1} d^{-1}$)
P_{O_2}	Actividad fotosintética ($mg_{O_2} g_X^{-1} h^{-1}$)
$P(W)$	Potencia necesaria (kWh)
Q	Flujo de líquido ($m^3 s^{-1}$)
Q_p	Coefficiente fotosintético
r	Densidad ($kg m^{-3}$)
R	Constante general de gases ideales ($1.9871 cal mol^{-1} K^{-1}$)
T	Temperatura (K)
t_d	Tiempo de duplicación celular (d)
V	Volumen del reactor (L)
V_m	Volumen molar ($L mol^{-1}$)
X	Concentración de biomasa ($g L^{-1}$)
X_0	Concentración de biomasa inicial ($g L^{-1}$)
X_t	Concentración de biomasa al tiempo t ($g L^{-1}$)
Y_{lip}	Rendimiento lípidos por fotón suministrado ($g_{lipidos} mol_{fotón}^{-1}$)
$Y_{HCO_3-/X}$	Rendimiento bicarbonato a biomasa
$Y_{NO_3-/X}$	Rendimiento nitrato a biomasa
$Y_{SO_4-/X}$	Rendimiento sulfato a biomasa
$Y_{HPO_4-/X}$	Rendimiento bifosfato a biomasa

Bibliografía

- Brown, L. M. & K. G. Zeiler (1993). *Aquatic Biomass & Carbon-Dioxide Trapping*. Energy Conversion & Management 34(9-11): pp. 1005-1013.
- Cabello, J., A. Toledo-Cervantes, L. Sanchez, S. Revah & M. Morales (2015). *Effect of the temperature, pH & irradiance on the photosynthetic activity by Scenedesmus obtusiusculus under nitrogen replete & deplete conditions*. Bioresource Technology 181: pp. 128-135.
- Cornet, J.-F., C. Dussap & J.-B. Gros (1998). *Kinetics & energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors*. Bioprocess & algae reactor technology, apoptosis, Springer: pp. 153-224.
- Dillschneider, R., C. Steinweg, R. Rosello-Sastre & C. Posten (2013). *Biofuels from microalgae: Photoconversion efficiency during lipid accumulation*. Bioresource Technology (142): pp. 647-654.
- Morales, M., J. Cabello & S. Revah (2015). *Gas Balances & Growth in Algal Cultures*. Algal Biorefineries, Springer: pp. 263-314.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture : biotechnology & applied phycology*. Ames, Iowa, E.U.A.: Blackwell Science.
- Sialve, B., N. Bernet & O. Bernard (2009). *Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable*. Biotechnology Advances v. 27 (4): pp. 409-416.
- Williams, P. J. L. & L. M. L. Laurens (2010). *Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics*. Energy & Environmental Science c. 3 (5): 554-590.

Lecturas recomendadas

- Cabello J. 2015. Doctorado en Biotecnología de la UAM. Tesis titulada: *Estudio de fotobiorreactores para el crecimiento de microalgas acumuladoras de aceite*. Dirigida por el Dr. Sergio Revah.
- Cabello J., Morales M., Revah S. 2014. *Dynamic photosynthetic response of the microalga Scenedesmus obtusiusculus to light intensity perturbations in an airlift photobioreactor*. Chem Eng J. 252: pp. 104-111.
- Sánchez L. 2013. Maestría en Biotecnología de la UAM-Iztapalapa Tesis titulada: *Cultivo a la intemperie de Scenedesmus obtusiusculus en un fotobiorreactor solar air-lift*. Dirigida por Dra. Marcia Morales.
- Toledo A. 2014. Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM. Tesis titulada: *Estudio de la acumulación de lípidos en una microalga aislada de Cuatro Ciénegas, Coahuila*. Dirigida por Dra. Marcia Morales.
- Toledo A., Morales M., Novelo E. Revah S. 2013. *Carbon dioxide fixation & lipid storage by Scenedesmus obtusiusculus*. Bioresour Technol. 130: pp. 652-65.

Capítulo 5

Procesos biocatalíticos

Humberto García Arellano*

Dolores Reyes Duarte**

Enzimas, actores principales de los procesos biocatalíticos

Las enzimas son proteínas que funcionan como catalizadores de los procesos biológicos. Su actividad se ha hecho presente desde hace miles de años en productos elaborados por la mano del hombre; por ejemplo, el uso del cuajo (quimosina) en la elaboración de quesos es uno de los primeros procesos enzimáticos. Sin embargo, es sólo hasta hace unas cuantas décadas que las enzimas se han venido estudiado apropiadamente y que se ha descubierto su gran capacidad para ser utilizadas como catalizadores en procesos industriales.

Las enzimas son capaces de aceptar una amplia variedad de moléculas complejas como sustratos, mostrando una alta selectividad y capacidad para catalizar reacciones con alta quimio-, enantio- y regioselectividad***, desarrollando una mínima formación de subproductos. Asimismo, las enzimas pueden llevar a cabo reacciones en condiciones suaves de temperatura, presión y pH, lo que permite que los procesos biocatalíticos ofrezcan una alternativa medioambiental adecuada a la catálisis química convencional.

Otra característica importante es su capacidad para trabajar tanto en medios acuosos como orgánicos (Buchholz, Kasche et al, 2012), lo que ha abierto una nueva gama de posibilidades

* Depto. de Ciencias Ambientales, UAM-Lerma. h.garcia@correo.ler.uam.mx

** Depto. de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa. dreyes@correo.cua.uam.mx

*** *Estereoselectividad* (habilidad para actuar sobre un determinado enantiómero o diastereómero en una mezcla racémica), *regioselectividad* (preferencia para actuar sobre una posición de la molécula selectivamente) y *quimioselectividad* (habilidad para actuar sobre un grupo funcional en presencia de otro con igual o mayor reactividad), son los distintos tipos de especificidad de las enzimas y es una propiedad que resulta importante en un proceso biocatalítico.

para la síntesis de compuestos químicos, en gran mayoría de naturaleza hidrofóbica, a través de procesos biocatalíticos. Como ventajas finales, al ser las enzimas de naturaleza proteica, son biodegradables y pueden ser fácilmente producidas a través de las nuevas tecnologías de ingeniería genética, por lo que la cantidad de enzima necesaria para los procesos no es en la actualidad un factor limitante como lo fue hace años cuando, por ejemplo, para obtener el cuajo era necesario sacrificar a las terneras para sacarlo de su cuarto estómago (García Garibay, Quintero Ramírez et al, 1993).

Las enzimas se clasifican en 6 grupos según el tipo de reacción que catalizan. En la tabla 5.1 se presenta la clasificación de acuerdo con la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB).

Tabla 5.1. Clasificación de enzimas de acuerdo a la IUBMB (IUBMB, 2005).

Clase	Tipo de reacción que cataliza	Ejemplos
1. Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (oxidación -reducción)	Lacasas, peroxidasas, alcohol deshidrogenasas, monooxigenasas.
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales	Glicosiltransferasas, cinasas, transaminasas.
3. Hidrolasas	Hidrólisis	Lipasas, esterasas, proteasas (penicilinacilasa, termolisina), glucosidasas (amilasas, celulasas, xilanasas, lactasa, invertasa), fosfatasa, nucleasas (DNAsas y RNAsas).
4. Liasas	Rompimiento de enlaces C-C, C-O, C-N por eliminación de grupos dejando dobles enlaces o anillos. Adición de grupos a dobles enlaces.	Aldolasas, fumarasas, descarboxilasas, aldehídotasas, anhidrasa carbónica.
5. Isomerasas	Isomerización	Glucosa isomerasa, triosafosfato isomerasa, mutasas, epimerasas, racemasas.
6. Ligasas (sintetasas)	Formación de enlaces con ruptura de ATP	Piruvato carboxilasa, acetilCoA sintetasa, glutamina sintetasa.

Actualmente existen varias bases de datos sobre enzimas, de las cuales una muy utilizada es BRENDA (www.brenda-enzymes.org). Este sistema de información está organizado en base a la clasificación de las enzimas por su número EC y permite obtener información sobre función y estructura de enzimas directamente extraída de literatura científica.

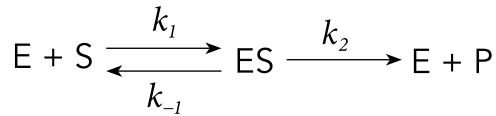
Cinética química y enzimática de las reacciones

Un poco de historia sobre la cinética enzimática

Los primeros estudios para tratar de elucidar los mecanismos de la catálisis enzimática se dieron a principios de 1900. Por esos años, Adrian J. Brown, un químico británico que era profesor de elaboración de malta y cerveza de la Universidad de Birmingham, estudiaba la fermentación de sacarosa por levaduras cuando se dio cuenta de que había ciertas sustancias producidas por estos microorganismos que aceleraban la fermentación. Brown logró aislar parcialmente esta sustancia (que a la postre resultaría ser una invertasa) y estudió la hidrólisis de la sacarosa por esta enzima. Durante sus estudios cinéticos, Brown se dio cuenta de que cuando la concentración de sacarosa era muy alta con respecto a la concentración de enzima, la velocidad de la reacción se hacía independiente de la concentración de la sacarosa, es decir la reacción se hacía de orden cero. Esta observación lo llevó a proponer el concepto de saturación y posteriormente llegaría a la conclusión de que este comportamiento podría ser explicado por la formación de un complejo entre las moléculas de invertasa y la sacarosa. Esta conclusión también implicaba que la reacción observada podía explicarse por medio de dos reacciones elementales, la primera que daba lugar a la formación del complejo enzima-sustrato y la segunda que descomponía el complejo para liberar al producto y regenerar la enzima. Brown publicó su trabajo en 1902 y ésta fue la primera vez que se dedujo un mecanismo de reacción enzimática a partir de datos cinéticos. Sin embargo, no era la primera vez que se planteaba la formación de estos complejos enzima-sustrato. Brown bien pudo haber formulado su mecanismo a partir de las ideas publicadas antes por Adolph Wurtz, quien en 1880 propuso la formación de complejos insolubles de papaína-fibrina, y de Cornelius O'Sullivan y Frederick Tompson quienes en 1890 habían notado que la actividad de la invertasa se conservaba a temperaturas elevadas cuando se encontraba en presencia de sacarosa. O'Sullivan y Tompson consideraron que esta conservación de la actividad invertasa sólo podía ser posible si existía una interacción entre la invertasa y la sacarosa. Brown también estaba al tanto de los trabajos previos realizados por el químico alemán Emil Fischer, quien ya en 1894 había observado que la especificidad de las enzimas podía explicarse mediante una interacción de ajuste perfecto entre la enzima y las moléculas de sustrato. Esta observación daría origen al modelo de llave y cerradura de Fisher muy popular aún en nuestros días (Eley, Pines et al, 1979; Laidler, 1997).

El siguiente paso importante en la historia de la catálisis enzimática llegó en 1913, cuando el químico alemán Leonor Michaelis y su asistente canadiense Maud Leonora Menten observaron que el efecto notado por Brown, en donde la velocidad de reacción se hacía independiente de la concentración de sustrato, solo aparecía a concentraciones de sustrato muy altas. Ellos se dieron cuenta de que a bajas concentraciones de sustrato la velocidad

de reacción era proporcional a la concentración y trataron de compaginar estas observaciones con la idea de la formación del complejo enzima-sustrato. El modelo que ellos propusieron fue el siguiente:



En esta ecuación, E es la enzima, S el sustrato, ES el complejo enzima-sustrato y P el producto. La hipótesis propuesta por Michaelis y Menten sugiere que el paso limitante en la reacción es la descomposición del complejo enzima-sustrato y que se establece un equilibrio entre las especies E, S y ES. Cuando se utilizan concentraciones de sustrato que son mucho mayores que la concentración de enzima, toda la enzima se encontrará saturada formando el complejo ES, la concentración de este complejo permanecerá constante y la reacción por tanto transcurrirá a velocidad constante cuando se varía la concentración del sustrato. Por el contrario, a concentraciones de sustrato bajas la enzima no estará saturada y la concentración del complejo ES, y por tanto la velocidad de la reacción, serán dependientes de la concentración de sustrato (Voet, Voet et al, 1999; Nelson, Lehninger et al, 2008; Cornish-Bowden, 2013).

Como resultado de este razonamiento, Michaelis y Menten desarrollaron su bien conocido modelo que introduce una constante, la constante de Michaelis-Menten. Esta constante es una medida de la afinidad de la enzima por un sustrato particular, valores bajos de esta constante indican que la enzima se une fuertemente a la molécula de sustrato, mientras que valores altos sugieren una unión débil entre estas dos moléculas.

Una derivación más general de la ecuación de Michaelis-Menten fue propuesta por Edward Briggs y John Haldane en 1925. Su propuesta sugería que la aproximación de Michaelis y Menten de considerar un equilibrio entre E, S y ES no siempre era correcta. Para solventar esto, la propuesta de Briggs y Haldane contemplaba que, transcurridos apenas unas fracciones de segundo, se formaba el complejo enzima-sustrato y este permanecía bajo un régimen de estado estacionario. El modelo matemático propuesto por Briggs y Haldane es, en esencia, idéntico al obtenido por Michaelis y Menten, la única diferencia se encuentra en la interpretación de la constante de Michaelis con respecto a las otras constantes de velocidad (Cornish-Bowden, 2013).

Con el desarrollo de nuevas metodologías de purificación y cristalización de las enzimas en las primeras décadas del siglo XX, fue posible estudiar con más detalle las interacciones entre las moléculas y sus sustratos, y el estudio de la cinética enzimática tuvo grandes avances. Los primeros estudios con una enzima pura, la tripsina, se realizaron hacia mediados de los años 40 del siglo pasado por John Alfred Valentine Butler. A partir de

esta fecha, con el desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías para análisis y producción de enzimas se han desarrollado numerosos estudios que han contribuido a una mayor comprensión del mecanismo y de la cinética de las enzimas (Pandey, 2006).

El desarrollo de modelos matemáticos que describen el comportamiento de las enzimas en presencia o ausencia de diferentes sustratos o inhibidores ha resultado crucial para el entendimiento de los mecanismos de reacción de las mismas y ha permitido también elucidar posibles funciones fisiológicas, así como sus mecanismos de regulación.

Las enzimas, al ser catalizadores de origen biológico, siguen las mismas leyes químicas y fisicoquímicas que rigen a los procesos químicos. De hecho, la cinética enzimática puede considerarse como una rama de la cinética química y para tratar de entenderla debemos revisar algunos conceptos importantes.

Principios de cinética química

Cinéticas de primer orden

Una expresión de velocidad para una reacción química debe contemplar el cambio en la concentración de los sustratos o reactivos en función del tiempo, de tal forma que las unidades de la velocidad de reacción deben expresarse como $M \cdot s^{-1}$.

Considera la siguiente reacción elemental en donde A representa al reactivo y P al producto:



Aunque la reacción (5.1) está representada como una reacción que ocurre en un solo paso, puede suceder que ocurra como una secuencia de reacciones parciales elementales que involucran la aparición de intermediarios de reacción. Estas reacciones se pueden representar de la siguiente manera:



Aquí, la descripción de todas y cada una de estas reacciones elementales resulta en la descripción del mecanismo global de dicha reacción.

La reacción (5.1) es un ejemplo de una reacción de primer orden. Cabe recordar que el orden de una reacción está determinado por el número de moléculas que participan en dicha reacción y no guarda relación con el coeficiente estequiométrico de las especies que intervienen en la misma. En otras palabras, el orden de la reacción describe el número de moléculas que deben interaccionar para generar un producto. El orden de las reacciones sólo puede determinarse experimentalmente, usualmente a través de las expresiones de velocidad de reacción.

Para reacciones de primer orden que ocurren a temperatura constante, como la reacción (5.1), la velocidad de la reacción es proporcional a la frecuencia con la cual las moléculas de A colisionan entre sí. Esta frecuencia de colisión entre las moléculas a su vez, es función de la concentración de A y puede expresarse matemáticamente con la ecuación (5.3).

$$v \propto [A] \quad (5.3)$$

Podemos sustituir el signo de proporcionalidad de esta ecuación por una constante de proporcionalidad, k , esta constante se conoce como constante de velocidad de reacción. Sustituyendo a k en la ecuación (5.3) podemos reescribirla de la siguiente manera:

$$v = k [A] \quad (5.4)$$

y también podemos expresarla en forma diferencial:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k [A] \quad (5.5)$$

Esta expresión nos señala que la velocidad de aparición de producto, $\frac{d[P]}{dt}$, o la velocidad de desaparición del reactivo, $-\frac{d[A]}{dt}$, es proporcional a la concentración de $[A]$, y puesto que la velocidad de reacción tiene unidades de $M \cdot s^{-1}$, la constante de velocidad k deberá tener unidades inversas de tiempo, s^{-1} .

Para encontrar el valor de la constante de velocidad es necesario integrar la ecuación (5.5). Para esto primero debemos reescribirla poniendo los términos comunes de un lado de la ecuación:

$$v = -\frac{d[A]}{[A]} = k dt \quad (5.6)$$

y posteriormente resolvemos la ecuación integrándola bajo los límites:

$$v = \int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_0^t dt \quad (5.7)$$

la solución para la ecuación (5.7) es:

$$v = \ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k \cdot t \quad (5.8)$$

La ecuación (5.8) representa la expresión de velocidad para una ecuación de primer orden. Podemos escribir esta ecuación de diferentes formas:

$$[A] = [A]_0 e^{-k \cdot t} \quad (5.9)$$

$$\ln [A] = \ln [A]_0 - k \cdot t \quad (5.10)$$

A partir de estas expresiones se puede obtener experimentalmente el valor de la constante de velocidad. La forma más simple para hacer esto es utilizando la ecuación (5.10), ya que tiene la forma de una ecuación de una línea recta $y = b - m x$. Usando nuestros datos experimentales y graficándolos como $\ln [A]$ vs. t obtendremos una línea recta con ordenada al origen igual a $\ln [A]_0$ y con una pendiente negativa cuyo valor es igual a la constante de velocidad de reacción $-k$, como se muestra en la figura 5.1. Puesto que en la ecuación (5.10) la constante de velocidad multiplica a t , k debe tener unidades inversas de tiempo (s^{-1}). El ajuste de los datos experimentales a una línea recta confirmará que la reacción (5.1) es de primer orden, mientras que cualquier desviación de un comportamiento lineal indicará que la reacción ocurre con un orden diferente de uno.

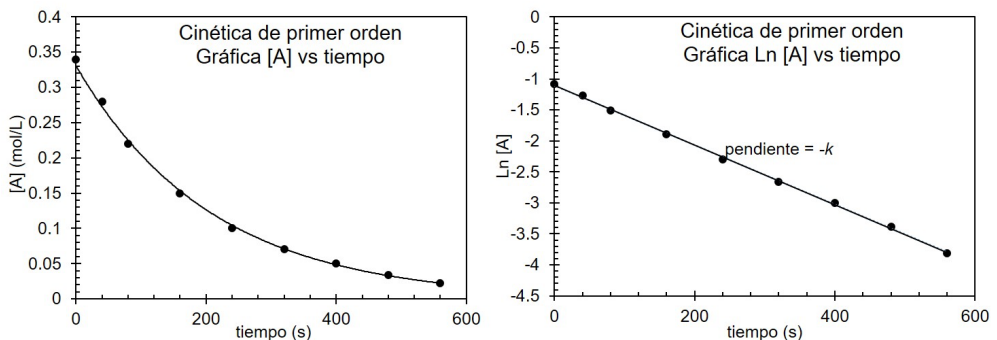


Figura 5.1. Cinética de primer orden.

Un caso interesante ocurre cuando la concentración del reactivo A se reduce a la mitad de la concentración inicial, $[A]_0$, esto es, cuando $[A] = \frac{1}{2} [A]_0$. Al tiempo que transcurre para que la reacción alcance esta condición se le conoce como vida media y se representa como $t_{1/2}$. Sustituyendo estas variables en la ecuación (5.8) obtenemos:

$$\ln \frac{\frac{1}{2}[A]_0}{[A]_0} = -k \cdot t_{1/2} \quad (5.11)$$

y resolviendo para $t_{1/2}$ tenemos:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (5.12)$$

La ecuación (5.12) define a la vida media como una constante para una ecuación de primer orden. Esto quiere decir que el tiempo que transcurrirá para que la concentración de un reactivo A se reduzca a la mitad de la concentración inicial siempre será el mismo independientemente de la concentración de A con la que se inicie el experimento.

Cinéticas de segundo orden.

En el caso de reacciones bimoleculares del tipo



la expresión general de velocidad está dada por

$$v = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \quad (5.14)$$

En esta expresión los exponentes a y b representan los órdenes de reacción respecto de las especies A y B. El orden global de la reacción, n , está dado entonces por la suma de estos exponentes, $n = a + b$. La ecuación (5.14) indica que las concentraciones de A y B tienen que elevarse a una potencia para demostrar el efecto que tienen en la velocidad de reacción. Cabe mencionar que el valor de estos exponentes puede ser un número entero o fraccionario. La forma diferenciada de la ecuación (5.14) puede escribirse de la siguiente manera:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \quad (5.15)$$

Existen diferentes aproximaciones para determinar la constante de velocidad y el orden de reacción en este tipo de reacciones. Estas aproximaciones resultan de simplificaciones basadas en las condiciones de concentración inicial de las especies reaccionantes. Para fines de análisis consideremos primero el caso en que las concentraciones de A y B son iguales, $[A] = [B]$. En este caso la reacción (5.13) puede reescribirse de la siguiente manera:



la expresión de velocidad para la ecuación (5.16) está dada por

$$v = k \cdot [A] \cdot [A] \quad \text{y} \quad v = k \cdot [A]^2 \quad (5.17)$$

En este caso, la reacción es de orden uno con respecto a A y con un orden global para la reacción igual a dos. La forma diferencial para la ecuación (5.17) será:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^2 \quad (5.18)$$

para resolver esta ecuación debemos reorganizarla e integrarla bajo los límites:

$$v = \int_{[A]_0}^{[A]} -\frac{d[A]}{[A]^2} = k \int_0^t dt \quad (5.19)$$

la solución para la ecuación (5.19) es:

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k \cdot t \quad (5.20)$$

Podemos reescribir esta ecuación de la siguiente manera

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k \cdot t \quad (5.21)$$

esta expresión es equivalente a una ecuación de una línea recta $y = b + m \cdot x$. Usando nuestros datos experimentales y graficándolos como $\frac{1}{[A]}$ vs. t obtendremos una línea recta con ordenada al origen igual a $\frac{1}{[A]_0}$ y con una pendiente cuyo valor es igual a la constante de velocidad de reacción, como se muestra en la figura 5.2.

En este caso, k tendrá las unidades $M^{-1} \cdot s^{-1}$. El ajuste de los datos experimentales a una línea recta confirmará que la reacción $A + A \rightarrow P$ es de segundo orden, mientras que cualquier desviación de un comportamiento lineal indicará que la reacción ocurre con un orden diferente de dos.

La vida media para una reacción de segundo orden está dada por:

$$t_{1/2} = \frac{1}{k[A]_0} \quad (5.22)$$

A partir de esta ecuación puede observarse que la vida media para reacciones de segundo orden depende de la concentración inicial del reactivom.

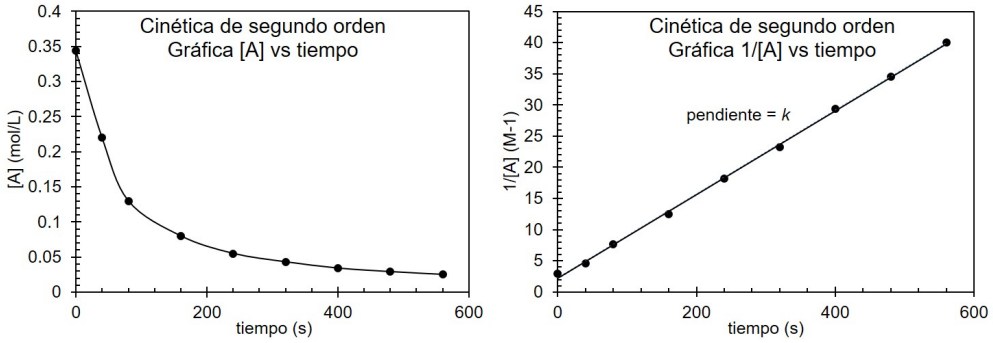


Figura 5.2. Cinética de segundo orden.

Para determinar la constante de velocidad de reacciones de segundo orden como la representada en la ecuación (5.13) usualmente se recurre a otra simplificación. Para este caso, la expresión cinética está dada por la ecuación (5.14), en donde el valor de los exponentes a y b es 1.



$$v = k \cdot [A] \cdot [B] \quad (5.24)$$

Esta expresión indica que la reacción es de orden uno respecto a A y B, de tal forma que la reacción es de segundo orden global. Para determinar experimentalmente la constante de velocidad de estas reacciones es común incrementar la concentración de uno de los reactivos para ponerlo en un exceso en relación a la concentración del otro reactivo, esto es $[B] \gg [A]$. Bajo estas condiciones se asume que la concentración de B, al ser muy alta, permanece constante y es la concentración de A la que determina la velocidad de la reacción. En este caso el análisis se simplifica al considerarla como una reacción de pseudo primer orden en la cual la constante de velocidad es una constante aparente que incluye la concentración inicial de B, como se muestra a continuación.

En exceso de reactivo B ($[B] \gg [A]$), podemos considerar a $[B]$ como una constante, y:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \cong k[A]^a \cdot [B]_0^b \cong k_{[B]} \cdot [A]^a \quad (5.25)$$

y en exceso de reactivo A ($[A] \gg [B]$):

$$v = -\frac{d[B]}{dt} = k \cdot [A]^a \cdot [B]^b \cong k \cdot [A]_0^a \cdot [B]^b \cong k_{[A]} \cdot [B]^b \quad (5.26)$$

Las ecuaciones (5.25) y (5.26) representan reacciones de pseudo primer orden en donde la constante de velocidad es una constante aparente. En estas ecuaciones $k_{[B]} = [B]_0$ y $k_{[A]} = [A]_0$. El valor real de k , se puede obtener a partir de las siguientes relaciones:

$$k \cong \frac{k_{[A]}}{[A]_0} \quad k \cong \frac{k_{[B]}}{[B]_0} \quad (5.27)$$

Este tipo de estrategias en las que se permite mantener la concentración de algunos reactivos casi constante, son herramientas valiosas para el análisis y simplificación de las cinéticas de reacción.

Cinética enzimática

Desarrollo de la ecuación de Michaelis-Menten

El factor clave que determina la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente es la concentración del sustrato. Sin embargo, estudiar los efectos de la concentración del sustrato a menudo resulta complicado ya que conforme procede la reacción, el sustrato se agota y la velocidad de reacción se ve afectada. Una manera de solventar este problema consiste en medir las velocidades iniciales, v_0 . En estudios *in vitro* es común que el sustrato se encuentre en un exceso de varios órdenes de magnitud en relación a la concentración de la enzima. Si la reacción se mide a tiempos cortos (usualmente menos de 1 min) la concentración de sustrato se mantendrá esencialmente constante. En estas condiciones es posible evaluar el efecto que tendrá la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción, v_0 , cuando la concentración de enzima también permanece constante. La figura 5.3 muestra un ejemplo de una cinética enzimática típica.

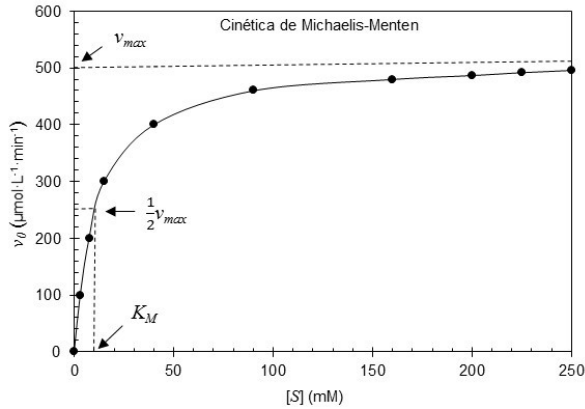


Figura 5.3. Gráfica de Michaelis-Menten.

Puede observarse a partir de esta gráfica que, a concentraciones bajas de sustrato, la v_0 aumenta de manera casi lineal conforme aumenta la concentración de sustrato, mientras que a concentraciones altas de sustrato el aumento en v_0 se hace cada vez más pequeño con el incremento en la concentración de sustrato. En esta zona de la gráfica, la curva muestra un comportamiento asintótico cuyo máximo teórico resulta ser la velocidad máxima, v_{max} , a la cual puede trabajar la enzima. El punto clave para entender este comportamiento cinético está en la aparición del complejo enzima-sustrato ES . Como vimos anteriormente, este complejo fue propuesto inicialmente por Adrian Brown y posteriormente Michaelis y Menten lo abordaron dentro de un modelo de reacción y cinético.



En este modelo las especies químicas E , S , ES y P corresponden a la enzima libre, el sustrato, el complejo enzima sustrato y producto respectivamente, mientras que k_1 corresponde a la constante de velocidad de segundo orden para la formación del complejo $[ES]$, k_{-1} es una constante de velocidad de primer orden para la disociación del complejo $[ES]$ y k_2 es una constante de velocidad de primer orden para la formación de producto. En los estudios de cinética enzimática usualmente estamos interesados en medir la velocidad de aparición del producto. A partir de la ecuación (5.28) podemos ver que la velocidad de aparición del producto es directamente proporcional a la concentración del complejo enzima sustrato $[ES]$. La expresión cinética para la formación de producto es:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (5.29)$$

Una expresión de velocidad que describa el comportamiento cinético global de la enzima debe tener en cuenta la concentración del complejo $[ES]$. Observando la ecuación (5.29), es evidente que la concentración del complejo $[ES]$ depende de las constantes de velocidad individuales k_1 , k_{-1} y k_2 . La ecuación de velocidad global para el complejo $[ES]$ puede expresarse de la siguiente manera

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad (5.30)$$

En esta ecuación el término $k_1 \cdot [E] \cdot [S]$ establece la velocidad de formación del complejo $[ES]$ mientras que los términos $k_{-1} \cdot [ES]$ y $k_2 \cdot [ES]$ establecen la velocidad de desaparición del complejo. Esta ecuación no puede resolverse con una integración sencilla, sin embargo, se pueden hacer algunas aproximaciones.

La aproximación del equilibrio de Michaelis-Menten

Basándose en los trabajos previos de Adrian Brown y Victor Henri, Michaelis y Menten propusieron que la constante de velocidad k_2 , es muy pequeña en relación a k_{-1} y que la velocidad de formación de $[ES]$ es igual a la velocidad de disociación del complejo. En otras palabras, Michaelis y Menten propusieron que $[ES]$ se encuentra en equilibrio:

$$k_1 [E][S] = k_{-1} [ES] \quad \text{para } k_{-1} \gg k_2 \quad (5.31)$$

Si $[ES]$ está en equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E] \cdot [S]} \quad (5.32)$$

en donde K_{eq} es la constante de equilibrio del complejo $[ES]$. Resolviendo la ecuación (5.32) para $[E]$, tenemos:

$$[E] = \frac{k_{-1} [ES]}{k_1 [S]} \quad (5.33)$$

Esta ecuación está expresada en términos de la concentración de enzima libre $[E]$ y de la concentración del complejo $[ES]$. Sin embargo, estas concentraciones no son fácilmente medibles y es por tanto necesario expresar la ecuación en términos de la concentración de enzima total, $[E]_T$, puesto que usualmente sabemos la cantidad de enzima que usamos en el ensayo. La enzima total, $[E]_T$, que se encuentra en la reacción puede encontrarse como enzima libre, $[E]$, o formando el complejo enzima-sustrato, $[ES]$, es decir:

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (5.34)$$

rearrreglando:

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (5.35)$$

Sustituyendo (5.35) en (5.33) y resolviendo para $[ES]$

$$[E]_T - [ES] = \frac{k_{-1}[ES]}{k_1[S]} \quad (5.36)$$

$$[E]_T = [ES] + \frac{k_{-1}[ES]}{k_1[S]} \quad (5.37)$$

$$[E]_T = [ES] \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]} \right) \quad (5.38)$$

$$[ES] = \frac{[E]_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]}} \quad (5.39)$$

Por otra parte, la velocidad de la reacción está dada por la ecuación (5.29), que expresándola en términos de $[ES]$ queda de la siguiente manera:

$$[ES] = \frac{v_0}{k_2} \quad (5.40)$$

Sustituyendo a (5.40) en (5.39) y resolviendo para v_0 tenemos:

$$\frac{v_0}{k_2} = \frac{[E]_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]}} \quad (5.41)$$

$$v_0 = \frac{k_2[E]_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]}} \quad (5.42)$$

y multiplicando ambos términos de la ecuación por $[S]$:

$$v_0 = \frac{k_2 [E]_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} \quad (5.43)$$

Bajo condiciones de saturación por sustrato toda la enzima estará formando el complejo [ES] y la enzima trabajará a su velocidad máxima, v_{max} , esto es:

$$v_{max} = k_2 [E]_T \quad (5.44)$$

Sustituyendo (5.43) en (5.42) tenemos:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} \quad (5.45)$$

Finalmente, podemos definir a la relación k_{-1}/k_1 como K_M , la constante de Michaelis-Menten. Sustituyendo en la ecuación (5.45) tenemos:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_M} \quad (5.46)$$

La ecuación (5.46) corresponde a la ecuación de Michaelis-Menten. Nota que en esta derivación de la ecuación, la K_M es efectivamente una constante de disociación del complejo enzima-sustrato.

La aproximación del estado estacionario de Briggs y Haldane

Hacia 1925, Briggs y Haldane propusieron una solución más general como alternativa a la aproximación de Michaelis y Menten, con el argumento de que la propuesta del equilibrio rápido no era estrictamente cierta. Haldane consideraba que una vez que se forma el complejo enzima-sustrato parte de este terminaba por disociarse para generar un producto y, por lo tanto, no podía disociarse para liberar a la enzima y el sustrato, alterando con esto el equilibrio del complejo [ES]. Briggs y Haldane propusieron que una vez que el sustrato entraba en contacto con la enzima, la concentración del complejo enzima-sustrato se incrementaba rápidamente pero después de cierto tiempo la concentración del complejo tendía a mantenerse constante porque parte de él también se disociaba para liberar el producto. Briggs y Haldane sugirieron que el complejo enzima-sustrato alcanzaba un estado estacionario en el que las velocidades de formación y de disociación eran similares. Esto se puede expresar con la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_2 \cdot [ES] \quad (5.47)$$

A partir de esta condición se puede derivar una expresión de velocidad global de la reacción enzimática. Podemos reescribir la ecuación (5.47) de la siguiente manera:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (5.48)$$

si asociamos las constantes tenemos:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = [ES] \cdot (k_{-1} + k_2) \quad (5.49)$$

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (5.50)$$

sustituyendo la ecuación (5.35) en (5.50):

$$\frac{([E]_T - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5.51)$$

Si definimos a,

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5.52)$$

Podemos rearrreglar la ecuación (5.51) de la siguiente manera:

$$K_M \cdot [ES] = ([E]_T - [ES]) \cdot [S] \quad (5.53)$$

Resolviendo para [ES],

$$[ES] = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.54)$$

sustituyendo la ecuación (5.40) en (5.54):

$$\frac{v_0}{k_2} = \frac{[E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.55)$$

$$v_0 = \frac{k_2 \cdot [E]_T \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.56)$$

Finalmente, si retomamos la ecuación (5.44) y la sustituimos en (5.56) obtenemos

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.57)$$

A la expresión (5.57), que es una expresión de velocidad que describe el comportamiento de las enzimas, se le conoce como la ecuación de Michaelis-Menten. Esta ecuación describe una hipérbola rectangular y es exactamente igual a la expresión obtenida por Michaelis-Menten cuando desarrollaron su hipótesis del equilibrio del complejo $[ES]$. La diferencia entre las ecuaciones (5.46) y (5.57) estriba en el significado de la constante K_M . Mientras que en el modelo del equilibrio propuesto por Michaelis-Menten la K_M es una constante de disociación verdadera, en el modelo del estado estacionario propuesto por Briggs y Haldane no lo es, ya que se incluye el valor de la constante de velocidad k_2 .

Significado físico de la K_M

El significado físico de la K_M puede deducirse bajo las siguientes condiciones:

Cuando $[S] \gg K_M$

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S]} = v_{max} \quad (5.58)$$

Cuando $[S] = K_M$

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + K_M} = \frac{v_{max} \cdot [S]}{[S] + [S]} = \frac{v_{max} \cdot [S]}{2[S]} = \frac{v_{max}}{2} \quad (5.59)$$

Así, cuando la concentración de sustrato es muy alta, la velocidad de la reacción se aproxima a la velocidad máxima, mientras que a concentraciones de sustrato iguales a la K_M la velocidad de la reacción será la mitad de su velocidad máxima (figura 5.3). Por lo tanto, el significado operacional de la K_M es muy sencillo, la K_M es la concentración de sustrato a la cual la enzima trabaja a la mitad de su velocidad máxima. Las unidades de la K_M serán, por tanto, unidades de concentración molar (M).

La K_M también representa la afinidad de la enzima por el sustrato. Para hacer esto más evidente, considera lo siguiente, partiendo de la ecuación (5.51).

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5.60)$$

rearrreglando:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1} \quad (5.61)$$

Si consideramos que el paso más lento en una reacción enzimática es la disociación del complejo $[ES]$ para liberar el producto ($k_2 \ll k_{-1}$), el segundo término en la ecuación (5.61) se hace despreciable y $K_M = K_S = k_{-1}/k_1$. El valor de K_M se aproxima entonces al valor de K_S , la constante de disociación del complejo ES . Un valor pequeño de K_M implica que la velocidad de formación del complejo $[ES]$ (determinada por k_1), es muy alta en relación a la velocidad con la que se descompone $[ES]$. Por el contrario, un valor grande de K_M implica que la velocidad de descomposición del complejo $[ES]$ (determinada por k_{-1}) es mayor que la velocidad de formación. Es debido a esto que se considera a la K_M como una medida de la afinidad por el sustrato. El valor de la K_M es único para cada par enzima-sustrato. De la misma forma, cada enzima que actúa sobre un mismo sustrato tendrá valores diferentes de K_M .

La gráfica ecuación de Michaelis-Menten muestra que a concentraciones altas de sustrato la velocidad permanece casi constante. En esta zona la ecuación describe una asíntota y por tanto es difícil alcanzar la velocidad máxima teórica porque para esto requeriríamos concentraciones muy altas de sustrato. Sin embargo, para efectos prácticos, basta usar concentraciones de sustrato que corresponden a diez veces el valor de la K_M . Bajo estas condiciones el valor de la v_0 es 90% de la v_{max} .

Si $v_0 = 0.9 v_{max}$:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = 0.9 v_{max} = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.62)$$

Resolviendo para $[S]$:

$$K_M + [S] = \frac{v_{max} \cdot [S]}{0.9 v_{max}} = \frac{[S]}{0.9} = 1.11 [S] \quad (5.63)$$

$$K_M = 1.11 [S] - [S] \quad (5.64)$$

$$[S] = \frac{K_M}{0.11} = 9.09 K_M \quad (5.65)$$

Esto es, para asegurarnos que la enzima trabaja al 90% de su v_{max} tendremos que usar concentraciones de sustrato al menos 10 veces mayores al valor de la K_M .

Constante catalítica, número de recambio y eficiencia catalítica

Como hemos discutido previamente, la velocidad de la reacción depende de la concentración del complejo [ES]:

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] \quad (5.66)$$

Bajo condiciones de saturación de sustrato toda la enzima presente en el medio de reacción estará en forma del complejo enzima-sustrato, la concentración de la enzima libre tiende a cero y la reacción funcionará a su velocidad máxima de tal forma que podemos reescribir la ecuación (5.66) de la siguiente manera:

$$v_{max} = k_2 \cdot [ES] \quad (5.67)$$

y como $[E]_T = [E] + [ES] \cong [ES]$, entonces:

$$v_{max} = k_2 \cdot [E]_T \quad (5.68)$$

y resulta que:

$$v_{max} = k_{cat} \cdot [E]_T \quad (5.69)$$

La constante k_{cat} es la constante catalítica y para sistemas de reacción simples como aquellos en los que se tienen enzimas con un solo sitio activo, o donde participa un solo sustrato, la k_{cat} es igual al valor de la k_2 , la constante de velocidad de primer orden para la liberación producto. La constante k_{cat} también es conocida como el número de recambio, ya que su valor refleja el número de ciclos catalíticos que cada molécula de enzima realiza por unidad de tiempo. Las unidades de esta constante son unidades recíprocas de tiempo (s^{-1}).

Consideremos ahora el caso en el que la concentración de sustrato es mucho menor a la K_M . Bajo estas condiciones casi toda la enzima en la reacción se encontrará en forma de enzima libre y se formará muy poco complejo ES. Si $[S] \ll K_M$, entonces $[E]_T = [E]$ y:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_2 [E]_T \cdot [S]}{K_M} = \frac{k_2}{K_M} [E] \cdot [S] \quad (5.70)$$

para sistemas simples, $k_{cat} = k_2$, entonces,

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E] \cdot [S] \quad (5.71)$$

La relación k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$) es una constante de velocidad de segundo orden y se le conoce como eficiencia catalítica de la enzima. Su valor refleja la frecuencia con la que la enzima y el sustrato se encuentran durante la reacción. Para visualizar esto considera el caso de que la reacción sea muy eficiente, es decir que la velocidad de descomposición del complejo [ES] para liberar el producto sea mucho mayor a la velocidad de descomposición para liberar sustrato. Si $k_2 \gg k_{-1}$, entonces:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_2 k_1}{k_{-1} + k_2} \quad (5.72)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = k_1 \quad (5.73)$$

Es decir, en el caso de una catálisis muy eficiente el valor de la relación k_{cat}/K_M se aproxima a la velocidad con la que se forma el complejo ES (determinada por k_1). Esta velocidad está determinada por la frecuencia con la que se encuentran la enzima y el sustrato en la reacción y su límite solo está condicionado por la velocidad de difusión. Para sistemas acuosos esta velocidad de difusión está en el orden de 10^8 - $10^9 M^{-1} s^{-1}$. Por tanto, las enzimas más eficientes serán aquellas cuya actividad sólo esté determinada por la difusión del sistema y tendrán valores de k_{cat}/K_M en el orden de 10^8 - $10^9 M^{-1} s^{-1}$.

Este parámetro, llamado eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) (cuando se tiene la enzima completamente pura) o coeficiente de especificidad (v_{max}/K_M) (cuando no se conoce la cantidad de moles de enzima utilizada), es muy útil para comparar la transformación de diferentes sustratos con la misma enzima o el mismo sustrato con diferentes enzimas (por ejemplo la degradación de metabolitos similares con una enzima, o los efectos del cambio de aminoácidos en la función de una enzima sobre un mismo sustrato).

Estimación de los parámetros cinéticos

La ecuación de Michaelis-Menten describe una gráfica con forma de una hipérbola rectangular. En principio es posible estimar el valor de los parámetros cinéticos K_M y v_{max} a partir de esta gráfica, sin embargo, no es un procedimiento muy recomendado. La razón de esto es que a concentraciones de sustrato muy altas el valor de v_0 se aproxima asintóticamente al valor de v_{max} por lo que no es posible estimar con exactitud este parámetro y como consecuencia tampoco el valor de la K_M . Para solventar este problema Hans Lineweaver & Dean Burk idearon una forma simple para estimar los datos cinéticos. Su método consistió en utilizar los recíprocos de la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente manera:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (5.74)$$

tomando los recíprocos a ambos lados de la ecuación:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{v_{max} [S]} \quad (5.75)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (5.76)$$

La ecuación de Lineweaver-Burk (5.76) es una ecuación de una línea recta de la forma $y = m x + b$. Obteniendo los recíprocos de los datos experimentales y graficando $1/v_0$ vs. $1/[S]$ se obtendrá una línea recta con pendiente positiva igual a K_M/v_{max} y con ordenada al origen igual a $1/v_{max}$. Si se extrapola la recta para encontrar la intersección en x, el valor obtenido será igual a $-1/K_M$. Este método representa una manera fácil y rápida para determinar los parámetros cinéticos, sin embargo, debe tenerse cuidado en la estimación de los valores de v_0 a concentraciones de sustrato muy pequeñas, ya que en la gráfica de recíprocos, errores aún pequeños, tienden a maximizarse.

El método de Lineweaver-Burk no es el único que se ha desarrollado para la estimación de los parámetros cinéticos. En el método de Hanes-Wolf, se obtiene el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten y luego se multiplica por $[S]$:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (5.77)$$

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{[S](K_M + [S])}{v_{max} [S]} \quad (5.78)$$

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \cdot [S] \quad (5.79)$$

De esta manera, graficando v_0 vs $[S]$ también genera una línea recta con pendiente positiva igual a $1/v_{max}$ y ordenada al origen igual a K_M/v_{max} . La extrapolación de la recta para encontrar la intersección en x proporcionará el valor de $-K_M$.

En el método de Eadie-Hofstee primero se obtiene el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten y posteriormente se multiplica por v_{max} :

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (5.80)$$

$$\frac{v_{max}}{v_0} = \frac{v_{max} (K_M + [S])}{v_{max} [S]} = \frac{K_M + [S]}{[S]} \tag{5.81}$$

$$v_{max} = \frac{K_M v_0}{[S]} + v_0 \tag{5.82}$$

$$v_0 = -K_M \frac{v_0}{[S]} + v_{max} \tag{5.83}$$

Graficando v_0 vs $v_0/[S]$ se obtiene una línea recta con pendiente negativa igual a $-K_M$ y ordenada al origen igual a v_{max} .

Estos métodos de linealización de la ecuación de Michaelis-Menten se han usado históricamente porque resultan ser rápidos y sencillos, sin embargo, en la actualidad cada vez se utilizan menos y se han ido sustituyendo por métodos de regresión no lineales que resultan más precisos. La figura 5.4 presenta un ejemplo de los métodos de linealización presentados en esta sección.

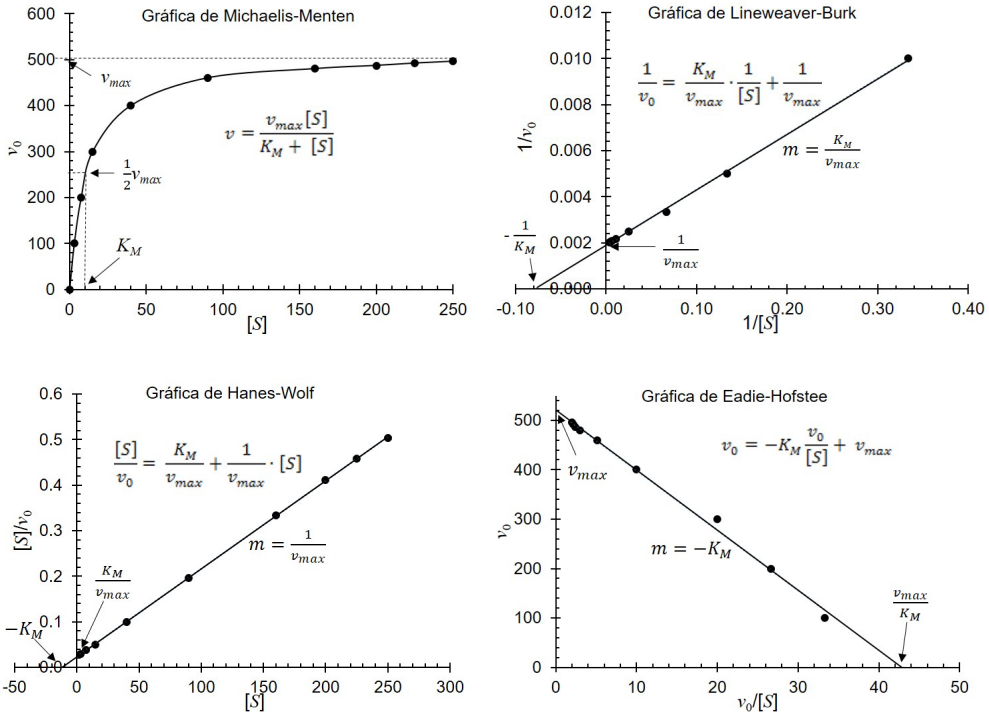


Figura 5.4. Métodos de linealización de la ecuación de Michaelis-Menten para la obtención de los parámetros cinéticos.

A partir de cualquiera de estos métodos es posible estimar los valores de K_M y v_{max} para una concentración de enzima previamente determinada. El valor de la constante catalítica, k_{cat} , puede estimarse directamente a partir de la ecuación (5.69). Sin embargo, una manera más precisa para estimar el valor de k_{cat} consiste en medir la v_{max} a diferentes concentraciones de enzima bajo condiciones de saturación de sustrato. La expresión (5.69) es una ecuación lineal, de tal forma que si se grafican los valores de la v_{max} en función de $[E]_T$ se obtendrá una línea recta con pendiente igual a k_{cat} (figura 5.5).

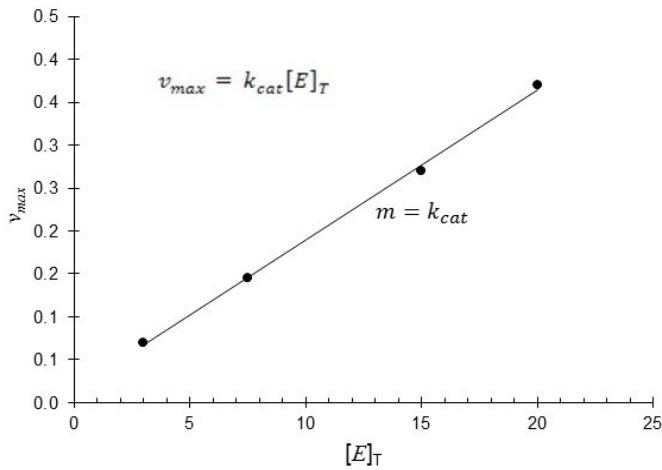


Figura 5.5. Estimación de la k_{cat} a partir de la ecuación (5.69).

Biocatalizadores

Todas las propiedades mencionadas en el apartado anterior sobre las características de las enzimas, hacen pensar que ellas se pueden utilizar en cualquier proceso, pero, ¿realmente todas las enzimas pueden ser biocatalizadores en procesos industriales? Una enzima para convertirse en un biocatalizador requiere ciertas características extras esenciales (Cheetham 1998; Petersen & Scouten, 1999):

- Debe ser robusta en los medios de reacción (soportar altas temperaturas, presiones, cambios de pH, etc.) y cumplir con la selectividad requerida para el proceso.
- Se debe poder producir en grandes cantidades y con pureza constante.
- Debe ser segura y mostrar reproducibilidad.

- Debe tener un alto número de recambio* (*turnover number*, k_{cat}).
- Debe ser indiferente al tipo de materia prima suministrada (siempre y cuando contenga al sustrato de interés).
- Debe ser una alternativa limpia a un proceso químico ya establecido y debe ser competitiva con otros procesos.
- Debe mostrar ventajas en la reducción de energía y residuos.

En resumen, un biocatalizador es una enzima, célula completa o anticuerpo catalítico con alta actividad requerida para desarrollar un proceso económicamente factible, que además cumple con las características antes mencionadas necesarias para hacer el proceso exitoso y costeable a nivel industrial (Cheetham, 1998). El término de biocatálisis se refiere al área de la biotecnología enfocada al análisis, diseño y operación de sistemas para la producción y utilización de catalizadores biológicos (enzimas-biocatalizadores).

Procesos biocatalíticos

Los procesos biocatalíticos se pueden definir como transformaciones de un determinado sustrato a un determinado producto, utilizando uno o varios pasos catalizados por enzimas (Bommarius & Riebel, 2004). Actualmente, los procesos multienzimáticos que acoplan uno o varios pasos biocatalíticos en un solo recipiente (*one-pot*) o combinados con otras reacciones químicas, son atractivos a nivel industrial por la reducción del número de etapas en los procesos, mejoras en la productividad, superación de las barreras termodinámicas (Wohlgemuth, 2010) y por ser procesos verdes o sustentables. Principalmente se utiliza para la síntesis de compuestos farmacéuticos que requieren varias etapas de protección y desprotección de grupos funcionales y donde las enzimas podrían disminuir estos pasos. Un ejemplo de aplicación potencial en la industria es en la síntesis de intermediarios de atorvastatina, un fármaco que se utiliza en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares ya que ayuda primordialmente, a disminuir los niveles de colesterol en sangre. El proceso biocatalítico propuesto (Ma, Gruber et al, 2010) involucra etapas de reducción, deshidrogenación y deshalogenación que cumplen con los principios de la química e ingeniería verdes (Hernández, López et al, 2016).

Los procesos biocatalíticos son cada vez más frecuentes en todo tipo de industrias (Illanes, 2008; Plou, 2016). En la década de los 90's, el número de procesos biocatalíticos desarrollados a gran escala se duplicó, cuantificando 134 biotransformaciones a gran escala (mayores a 100 kg) con células completas o enzimas (Straathof & Adlercreutz, 1999). En la industria química, la producción de acrilamida a partir de acetonitrilo utili-

* Número de moléculas de sustrato que puede transformar una molécula de enzima por segundo.

zando la enzima nitrilo hidratasa ha alcanzado una producción de 30,000 toneladas por año (Hagen, 2006). En la producción de químicos finos, las aminoacilasas, amidasas y recientemente lipasas y esterases son las más exitosas para la obtención de compuestos enantioméricamente puros. En la producción de fármacos, la penicilina acilasa se utiliza para la síntesis de antibióticos β -lactámicos, como las penicilinas. En la industria alimentaria hay una larga lista de aplicaciones de procesos biocatalíticos: la producción de jarabes fructosados a partir de glucosa utilizando la glucosa isomerasa, la síntesis del endulzante Aspartame, catalizada por la termolisina, y la síntesis de ésteres de azúcares como tensoactivos naturales utilizando lipasas (Ballesteros, Plou et al, 2007), son algunos ejemplos. En la figura 5.6 se muestra una lista de compuestos comerciales producidos por procesos biocatalíticos.

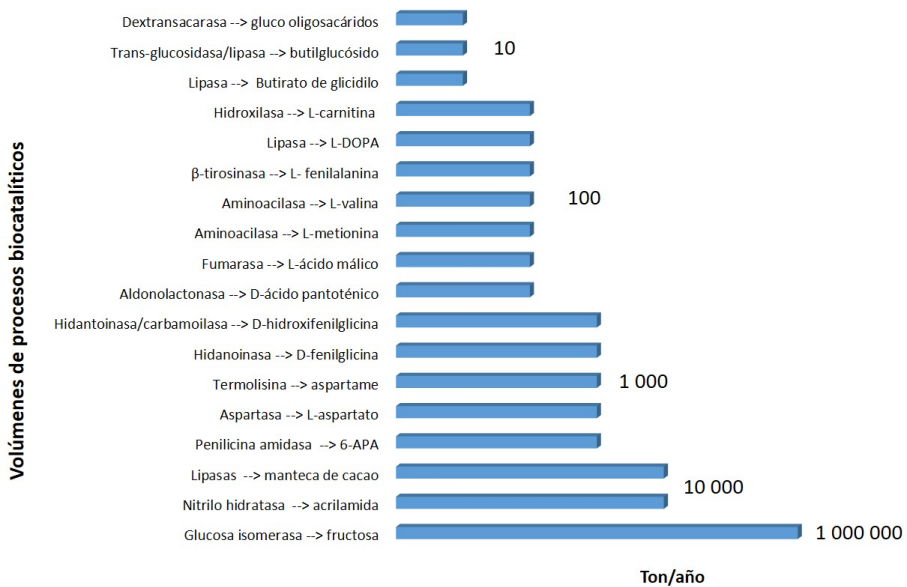


Figura 5.6. Compuestos comerciales producidos por vía biocatalítica.* Modificado de (Powell, Ramer et al, 2001).

También en las industrias de detergentes, agroquímica, energética, ambiental, panadería, textil, papelera y recientemente, en la médica, se utilizan los procesos biocatalíticos (Charnock & McCleary 2017). En la figura 5.7, se presenta la demanda mundial de enzimas por tipo de mercado y se observa que las aplicaciones industriales siguen abarcando el 60% del mercado total (Enzymes Market Size & Share, 2017; Industrial Enzymes Market, 2017). Dentro de ellas, las de alimentos y bebidas son las mayoritarias, seguidas por las técnicas, de detergentes y de alimento animal. Se estima que el mayor crecimiento

* El volumen de producción es el reportado hasta antes del año 2000.

entre 2016 y 2024 será para el mercado de enzimas en alimentos y bebidas, con un 10% (Enzymes Market Size & Share, 2017; Industrial Enzymes Market, 2017). En este mercado, las industrias involucradas son lácteos, panadería, bebidas, jarabes y endulzantes, y cervecería, principalmente.

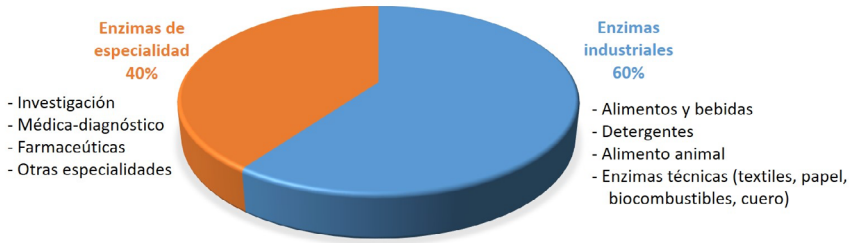


Figura 5.7. Estimación de la demanda mundial de enzimas por tipo de mercado, en 2016 (Enzymes Market Size & Share, 2017; Industrial Enzymes Market, 2017).

La mayoría de las enzimas industriales que participan en estos procesos pertenecen al grupo de las hidrolasas, grupo que abarca cerca del 65% en número de aplicaciones industriales (Aehle, 2003). Entre ellas se encuentran: lipasas, esterases, fitasas, amilasas, celulasas, xilanasas, proteasas y diversas glicosidasas. El otro 35% son procesos catalizados por enzimas pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas, transferasas, liasas e isomerasas. Algunos ejemplos son: glucosa oxidasas, lacasas, catalasas, dextranacarasas, transglutaminasas, pectin-liasas, xilosa isomerasas, etc. En la figura 5.8 se observa la distribución por aplicación de estas enzimas.

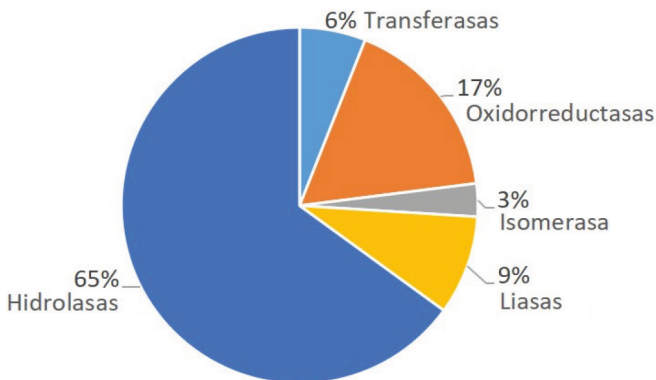


Figura 5.8. Distribución por aplicación de enzimas en la industria (Aehle, 2003).

Como se puede observar en esta misma figura 5.8, dentro del grupo de las ligasas (sintetasas), no existe ninguna aplicación industrial debido básicamente a la necesidad de incorporar ATP como cosustrato y su elevado costo (500 pesos*/mmol de ATP.) lo limita. Sin embargo, enzimas dependientes de cofactores, como las oxidorreductasas y transferasas, ya se utilizan a nivel industrial (en menor proporción que las hidrolasas) por su capacidad para llevar a cabo reacciones químicas más complejas. Esto se ha conseguido a través del diseño de estrategias como la regeneración de cofactor (Wood-*yer*, Johannes et al, 2006) o la innovación en preparaciones enzimáticas que ya incluyen enzima-cofactor (2005). Por otro lado, también es posible desarrollar reacciones de síntesis catalizadas por enzimas y, de hecho a nivel industrial ya existen numerosos ejemplos de ello. Estas reacciones se llevan a cabo principalmente por las hidrolasas en disolventes orgánicos (Zaks & Klibanov, 1985).

En la tabla 5.2 se numeran algunos procesos industriales donde interviene alguna etapa enzimática, las enzimas involucradas y la compañía que desarrolla el proceso.

El mercado global para las enzimas utilizadas en procesos industriales en 2013 fue de 4.7 billones de dólares y se estima que en 2022 alcance 6.3 billones de dólares, a una tasa de crecimiento anual de 5.8% (Global Industry Report Summary, 2017.). Esto se debe a la tendencia mundial “obligatoria” de que las industrias desarrollen procesos más limpios o de “química verde” que protejan el medioambiente, reemplazando o incluyendo biocatalizadores en lugar de catalizadores químicos (Grunwald, 2014). Por otra parte, el mercado de salud y bienestar, también está experimentando un rápido crecimiento por la mayor demanda de comida natural saludable y nutracéuticos, requiriendo aditivos alimentarios, incluyendo a las enzimas, que provengan de fuentes naturales (Mordor-Intelligence, 2015) o que sean sintetizados por ellas. De esta forma, el campo de las enzimas aplicables a procesos biocatalíticos está experimentando un mayor número de iniciativas de investigación y desarrollo (I+D) que ofrezcan resultados tanto en el desarrollo de nuevos productos como en el mejoramiento de procesos y desarrollo de productos ya existentes (Rajan, 2004).

* El precio para ATP microbiano en 2017 del catálogo de Sigma Aldrich.

Tabla 5.2. Biotransformaciones a escala industrial (Zaks, 2001; Bommarius & Riebel, 2004; Hagen, 2006).

Producto	Enzima	Compañía
Jarabes de alta fructosa	Glucosa isomerasa	Varias
Leche deslactosada	Lactasa (β -galactosidasa)	Varias
Acrilamida	Nitrilasa	Nitto Co.
Manteca de cacao	Lipasas	Fuji Oil
Nicotinamida	Nitrilasa	Lonza Guangzhou
Ácido D-pantoténico	Aldonolactonasa	Fuji Pharmaceuticals
Aspartame	Termolisina	Tosoh/DSM
Ácido 6-aminopenicilánico	Penicilina acilasa	Varias
D-fenilglicina	Hidantoinasa/carbamoilasa	Kanegafuchi
L-aspartato	Aspartasa	Varias
Ampicilina	Penicilin-amidasa	DSM
L-carnitina	Dehidrasa/hidroxilasa	Lonza
L-dopa	β -tirosinasa	Ajinomoto
(R)-ácido mandélico	Nitrilasa	BASF
Amoxicilina, ampicilina, loracarbef, xemilofiban	Penicilina acilasa	Lilly
Xemilofiban	Penicilina acilasa	Monsanto
Intermediario en la síntesis de paclitaxel	C-10 deacetilasa	Bristol-Myers Squibb
Resoluciones enantioselectivas	Proteasas/lipasas	Hoffman-La Roche
Intermediario de atorvastatina	Nitrilasa	Diversa (ahora Verenum-BASF)
Zanamivir (Relenza)	Aldolasa/epimerasa	GlaxoSmithKline

Clasificación de los procesos biocatalíticos

Los procesos biocatalíticos se pueden clasificar de distintas maneras. A continuación se enumeran algunas, aunque pudieran existir otras más.

1. **Tipo de enzima.** Si involucran el uso de enzimas solubles, enzimas inmovilizadas, microorganismos o células completas (principalmente cuando las enzimas necesitan regenerar cofactores).
2. **Origen de la enzima.** Si proviene de organismos nativos, aunque posteriormente sea clonada en huéspedes, o si ya sufrió alguna modificación por técnicas moleculares para mejorar sus propiedades.
3. **Medio de reacción.** Acuoso, orgánico, fluidos supercríticos, vapor, etc.
4. **Volumen de reacción.** Escala laboratorio (3-10 mL), escala piloto (0.5-500L), escala industrial (varios metros cúbicos).
5. **Tipo de producto.** Productos masivos (commodity) como la acrilamida y los jarabes fructosados o productos finos, como los fármacos y esteroides.
6. **Tipo de sustrato.** Materias primas sin procesar (como granos, subproductos agrícolas, suelo y agua contaminados) o compuestos químicos (mezclas racémicas, precursores de fármacos, aminoácidos, etc.).
7. **Tipo de aplicación de la enzima.** Procesos donde se adiciona en grandes cantidades (*bulk*), como en las industrias de detergentes, textiles, pulpa y papel, alimentación animal (ejemplos de estas enzimas: proteasas, amilasas, glucanasas, lipasas, celulasas, xilanasas, fitasas); o en cantidades pequeñas como catalizador (químicos básicos, químicos finos, alimentos, protección de granos, farmacéuticos) (ejemplos: lipasas, proteasas, oxidorreductasas, aldolasas (Eley, Pines *Et al.*, 1979).
8. **Tipo y configuración de reactor.** La configuración es el modo de operación, el cual puede ser en lote (discontinuo), continuo, discontinuo alimentado, si es con recirculación, si se manejan dos tipos de reactor, etc. Los tipos de reactor pueden ser muy variados, desde tanque agitado, tubular, de lecho fluidizado, lecho empacado, de flujo pistón, de membrana, etc.
9. **Tradicional y no tradicional.** La primera es donde los sustratos, enzimas y productos se encuentran en la misma fase acuosa. La segunda puede ser de innumerables formas: sustratos y enzimas en fase acuosa y recuperación de producto en fase orgánica; sustratos y productos en fase orgánica y enzima en acuosa, todos en fase orgánica, etc. (Davison, Barton *Et al.*, 1997)

Etapas de un proceso biocatalítico.

Aunque cada proceso es diferente y pueden ser muy heterogéneos entre ellos, se podría presentar un panorama general de los procesos biocatalíticos en los siguientes pasos: pre-tratamientos o preparación de la materia prima, reacción biocatalítica, recuperación de productos y si es necesario, su purificación. En las figuras 5.9 y 5.11 se presentan diagramas generales: uno para procesos que utilizan materias primas en bruto y otro para procesos que parten de químicos finos. El diagrama de la figura 5.9 está ejemplificado por distintos procesos para la producción de un mismo producto, bioetanol. El bioetanol es una prometedora alternativa a los combustibles fósiles, por lo que el desarrollo de bioprocesos para producirlo está en apogeo. En esta misma figura, también se incluyen los productos finales alternos a la producción de bioetanol, como los alimentos para animales y otros biocombustibles.

Tomando la clasificación por tipo de sustrato, y partiendo de una materia prima como granos, subproductos agrícolas (como bagazo de caña, pulpa de café), aguas residuales, etc. es necesario pasar por algún tipo de pretratamiento previo al catalítico. Estos pueden ser mecánicos (molido, tamizado, cribado, etc.), térmicos, químicos, entre otros. La etapa biocatalítica varía dependiendo del tipo de reacción que se llevará a cabo: licuefacción, sacarificación, fermentación, hidrólisis, síntesis, etc. La recuperación de producto es el siguiente paso, y se puede realizar por destilación, secado, concentración, precipitación, filtración, etc. Si en los pasos anteriores el producto deseado no se obtiene con la suficiente pureza, el proceso debe incluir una etapa de purificación final.

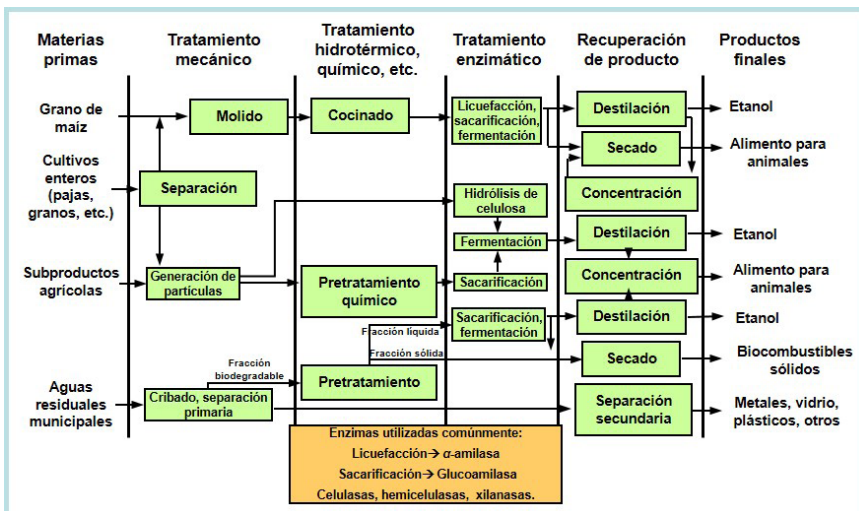


Figura 5.9. Etapas generales de un proceso biocatalítico. Diagrama de diversos procesos para la producción de bioetanol. Sistema integrado de utilización de biomasa, Abengoa Energy.

Si la materia prima del proceso biocatalítico es un compuesto químico, los pasos de pretratamiento (mecánico, térmico, etc.) por lo general, no son necesarios. Posiblemente en algunos casos, el tratamiento químico sea requerido, pero lo más probable es que el proceso se inicie directamente en la reacción enzimática. Un ejemplo es la producción de Aspartame utilizando termolisina (figura 5.10).

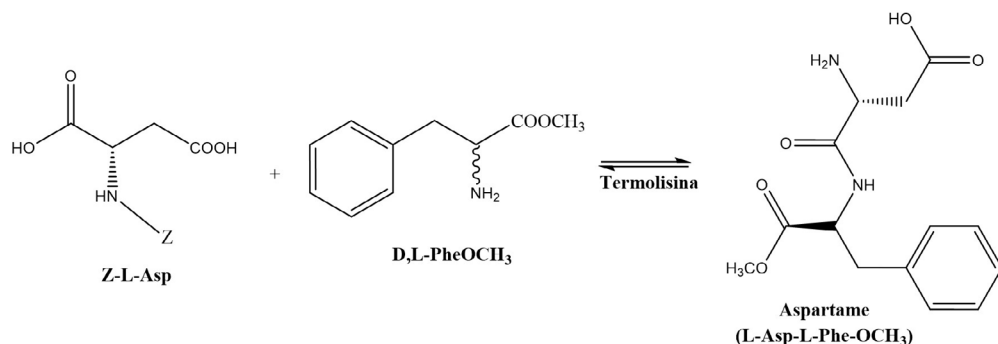


Figura 5.10. Reacción de la termolisina para la síntesis de Aspartame.

El aspartame es un dipéptido 200 veces más dulce que la sacarosa y en la actualidad es ampliamente utilizado como endulzante no calórico en un sinnúmero de productos, por lo que su demanda ha crecido alcanzando volúmenes de producción de 12,000 a 15,000 toneladas por año (Buchholz, Kasche et al, 2012). Uno de los procesos de producción de Aspartame más exitosos es el proceso enzimático que trabaja la industria Toya Soda (figura 5.11). Este proceso se basa en la síntesis del L-ácido aspártico con el éster metílico de la L-fenilalanina (proveniente de una mezcla racémica), catalizada por la enzima termolisina (Bommarius & Riebel, 2004, Buchholz, Kasche et al, 2012). El proceso se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH 7.0-7.5, 50°C y en medio acuoso). La reacción está limitada por la posición de equilibrio, por tanto, los productos deben retirarse de la mezcla para poder alcanzar altos rendimientos. El exceso de metil éster de fenilalanina hace que el Aspartame forme un catión poco soluble que precipita en la mezcla de reacción, lo que facilita su recuperación por filtración. El último paso del proceso es eliminar el grupo protector por una hidrogenación convencional. Este proceso biocatalítico presenta un rendimiento final mayor al 99.9%, como consecuencia de la alta estereoselectividad de la enzima (Hagen, 2006).

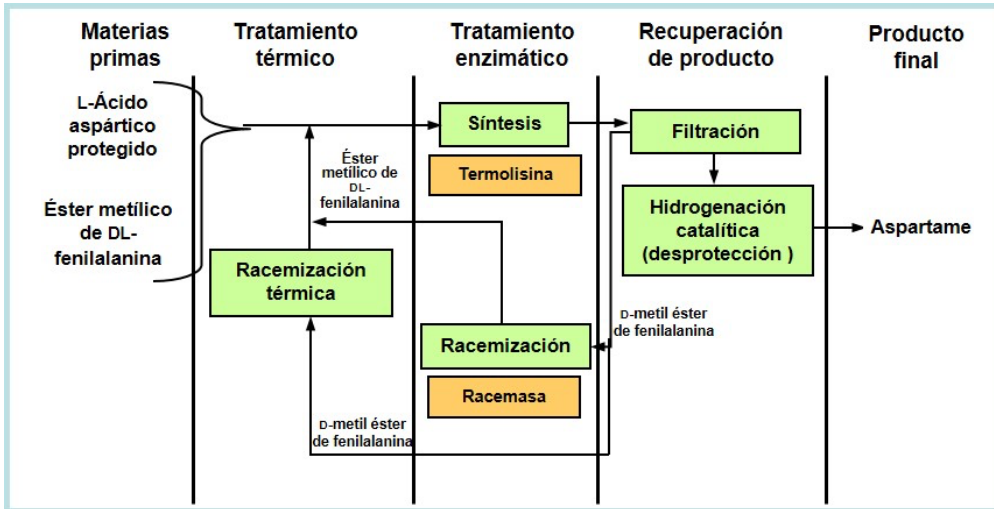


Figura 5.11. Etapas generales de un proceso biocatalítico. Diagrama de la producción de Aspartame.

En torno al proceso biocatalítico, existen cuatro componentes técnicos integrales (selección del biocatalizador, caracterización del biocatalizador, ingeniería del biocatalizador y del proceso, y modelamiento del proceso) necesarios para desarrollar un proceso a escala piloto y demostrar su factibilidad económica (figura 5.12) (Schmid, Dordick et al, 2001; Zhao, Chockalingam et al, 2002).

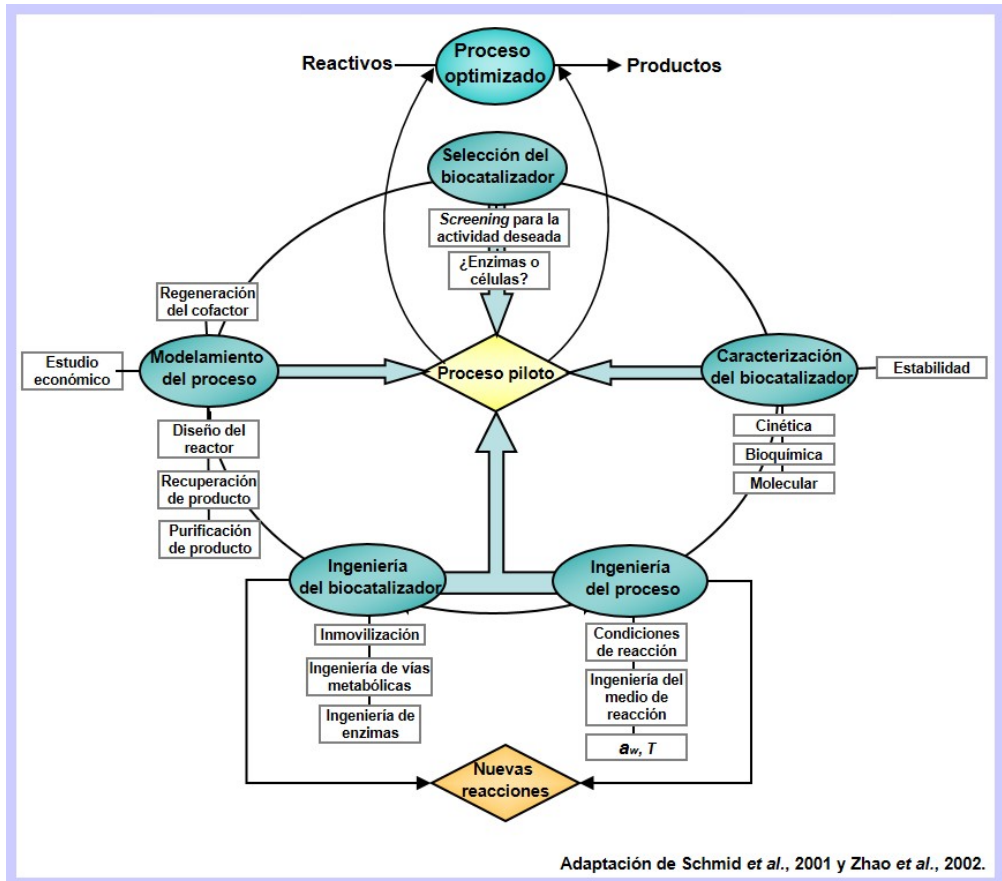


Figura 5.12. Desarrollo de un proceso biocatalítico.

Por lo general, para desarrollar un proceso biocatalítico se parte del producto de interés, el cual, tal vez puede producirse por distintas reacciones enzimáticas que conviertan los sustratos adecuados en el producto deseado. Posteriormente se identifican y seleccionan uno o más posibles biocatalizadores y se instala un proceso, el cual debe ser económicamente factible. Los aspectos limitantes del proceso biocatalítico se mejoran de manera iterativa, gradualmente dirigidos hacia la elaboración de un proceso más eficiente (figura 5.12). Estos aspectos incluyen:

1. Selección del biocatalizador: Se parte de un *screening* para la búsqueda de la actividad deseada; puede ser con enzimas nativas o modificadas comerciales, a partir de colecciones de microorganismos, o a partir de genotecas metagenómicas de microorganismos no cultivables provenientes de distintos ambientes (Handelsman, 2005; Fernández, Guazzaroni et al, 2010). Además se debe elegir si se usan células completas o enzimas puras.

2. Caracterización del biocatalizador: Considera el estudio cinético (actividad específica, parámetros cinéticos como γ), bioquímico (perfil de reconocimiento de sustratos, pH y T óptimos, mecanismo catalítico) y molecular (masa molecular, secuencia de la proteína, estructura) del biocatalizador. También se debe estudiar su estabilidad al medio de reacción, a la temperatura o a posibles inhibidores presentes en el medio (sobre todo si se parte de una materia prima en bruto).
- 3a. Ingeniería del proceso: Considera el desarrollo de las condiciones de reacción (selección del medio de reacción —acuoso, orgánico, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, etc.— T, pH, actividad de agua (a_w) y la ingeniería del medio de reacción (mezclas de disolventes, aditivos).
- 3b. Ingeniería del biocatalizador: Aplicación de técnicas de inmovilización (adsorción, absorción, encapsulamiento, enlace covalente multipuntual, entrecruzamiento —CLEC's y CLEA's— atrapamiento en membranas, etc.). Algunos de los biocatalizadores se utilizan inmovilizados, como catalizadores heterogéneos, y que pueden ser recuperados y reutilizados, pero la mayoría son procesos basados en células suspendidas o enzimas en sistemas homogéneos, que son suficientemente baratas para permitir un único uso, sin recuperación o reutilización (figura 5.13) (Straathof, Panke et al, 2002). También considera el uso de técnicas de modificación química, modificación genética de la enzima (ingeniería de proteínas: diseño racional, evolución dirigida, etc.) o de las vías metabólicas del microorganismo.

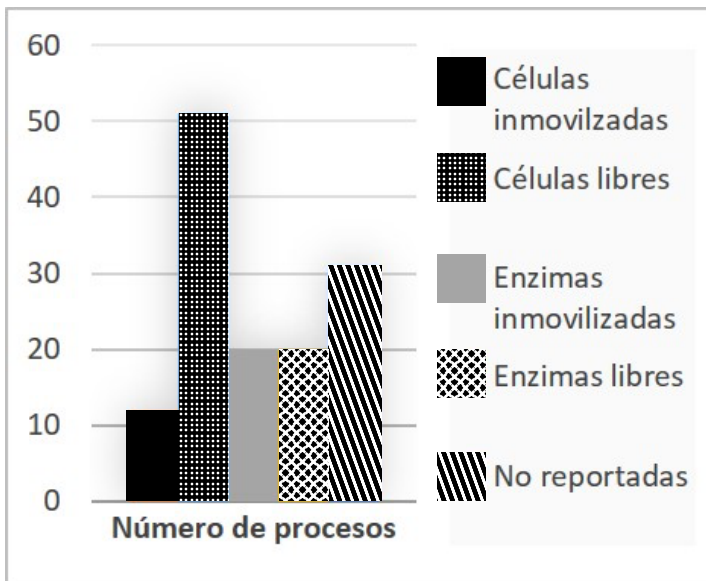


Figura 5.13. Uso de enzimas o células completas en procesos biocatalíticos industriales (basado en 134 procesos) Modificada de (Straathof, Panke *Et al.*, 2002).

3. Modelamiento del proceso: Un punto clave para que un proceso biocatalítico pueda desarrollarse, es su factibilidad económica. Dado que el biorreactor representa la parte central del proceso (ya que es donde la reacción enzimática se lleva a cabo bajo condiciones controladas) su elección es de gran importancia. Dependiendo del tipo de biocatalizador a utilizar, se requiere un reactor específico (tanque agitado, lecho empacado, lecho fluidizado, de membrana, flujo pistón, etc.) y configuraciones particulares (operación del proceso en discontinuo (lote), continuo, o discontinuo alimentado) (Buchholz, Kasche et al, 2012). Si bien la mayoría de los procesos biocatalíticos industriales se realizan en discontinuo, la necesidad de mayores productividades y rendimientos ha modificado algunos procesos hacia la operación en sistema continuo. Los reactores continuos son frecuentemente utilizados en combinación con células o enzimas inmovilizadas, especialmente para aplicaciones de menor escala (figura 5.14). En la industria de agro-alimentaria, los reactores de membrana son muy utilizados por la ventaja de mantener las enzimas inmovilizadas. Principalmente se usan para reducir la viscosidad de jugos al hidrolizar pectinas, reducir el contenido de lactosa en leche, como tratamiento de mostos y vinos por la conversión de compuestos polifenólicos y antocianinas, y por eliminar peróxidos de productos lácteos (Giorno & Drioli, 2000). Los reactores discontinuos alimentados, involucran principalmente células completas (Straathof, Panke et al, 2002). En esta etapa también se define cómo recuperar el producto (remover el producto al tiempo que se produce *in situ* o al final del proceso) y los pasos de purificación si fueran necesarios. Si el biocatalizador requiere cofactor, como en los procesos de oxidación donde son requeridos para mediar la transferencia electrónica, es necesario estudiar y desarrollar un paso de regeneración del cofactor.

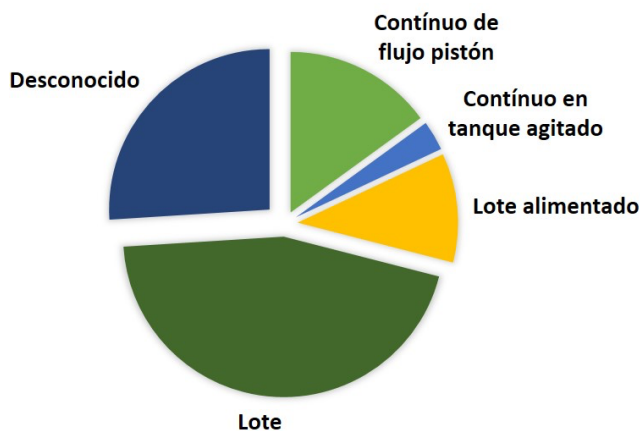


Figura 5.14. Tipos de reactores usados en procesos biocatalíticos industriales. Valores estimados (Straathof, Panke *Et al.*, 2002).

Caracterización de un proceso biocatalítico

Al evaluar el desarrollo de un proceso biocatalítico, no sólo se debe considerar la caracterización previa del biocatalizador (actividad, selectividad, estabilidad, parámetros cinéticos), sino que existen una serie de criterios relativos al proceso en sí que deben analizarse (Bommarius & Riebel, 2004):

- i. Rendimiento de producto
- ii. Productividad del biocatalizador
- iii. Estabilidad del biocatalizador
- iv. Productividad del reactor

De hecho, hoy en día, la mayoría de los procesos biocatalíticos comerciales comparten diversas características donde se ven reflejados estos criterios (Schmid, Dordick et al, 2001; Buchholz, Kasche et al, 2012):

- a. Altos rendimientos de productos a altas concentraciones y pureza. Es decir, se obtienen bajas concentraciones de subproductos y se requieren bajas concentraciones de aditivos, como amortiguadores.
- b. Alta productividad del catalizador. Es decir, alta efectividad y buena estabilidad operacional.
- c. Utilizan enzimas que no requieren cofactores caros.
- d. Tratan de manejar bajos costos de manufactura y mantenimiento, así como poco requerimiento de espacio. Esto significa utilizar preferentemente un solo reactor o pocos reactores con pequeños volúmenes y mínimo equipamiento.

Rendimiento de producto

El rendimiento del producto es uno de los factores más importantes en la economía de un proceso debido a que, por lo general, el costo del sustrato llega a ser mayor al 50% de los costos variables. Por esta razón es indispensable que los rendimientos de un proceso sean altos (Bommarius & Riebel, 2004).

El rendimiento de producto (y) es inversamente proporcional a la cantidad de reactantes requeridos por unidad de producto obtenido.

$$y = \frac{\text{Cantidad de producto}}{\text{Cantidad de reactantes}} \quad (5.84)$$

Este factor está relacionado con la selectividad (σ) y el grado de conversión (x), a través de la ecuación (5.85):

$$y = x \cdot \sigma \quad (5.85)$$

Por tanto, la concentración de producto [P] se puede estimar con la siguiente ecuación:

$$[P] = [S]_0 \cdot y = [S]_0 \cdot x \cdot \sigma \quad (5.86)$$

En la separación de compuestos racémicos, donde el rendimiento por corrida está limitado a 50%, es necesario reciclar el compuesto sin reaccionar, con el objetivo de aumentar el rendimiento final.

La exitosa separación de compuestos racémicos utilizando procesos biocatalíticos se debe a la exquisita selectividad de las enzimas. Un ejemplo es la producción de aminoácidos utilizando aminoacilasas (Aehle, 2003).

La demanda de L-aminoácidos para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas está creciendo rápidamente. Su producción se realiza tanto química como biocatalíticamente, sin embargo el método biocatalítico presenta una ventaja importante: la alta especificidad. El proceso industrial se basa en la separación enantioselectiva de *N*-acetil-DL-aminoácidos por la enzima aminoacilasa. El *N*-acetil-L-aminoácido se hidroliza produciendo aminoácidos L, mientras el compuesto con el aminoácido D no reacciona (figura 5.15). Posteriormente, el aminoácido L se separa por intercambio iónico o cristalización, y el *N*-acetil-D-aminoácido sin reaccionar se recicla por racemización térmica o por una racemasa para alcanzar un rendimiento de 45% sobre un máximo de 50%, aproximadamente (Hagen, 2006).

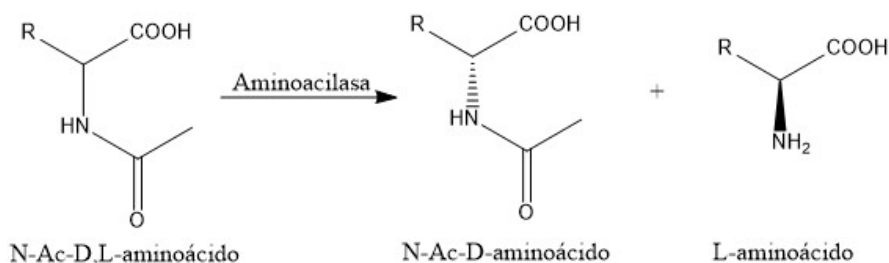


Figura 5.15. Reacción de la aminoacilasa para la obtención de L-aminoácidos.

Este proceso en sus inicios, alrededor de 1954, se desarrollaba en lote en reactores agitados. En 1969, se comenzó a desarrollar el proceso en un reactor de lecho fijo con la enzima inmovilizada en el soporte DEAE-Sephadex. Fue hasta 1982 cuando Degussa escaló este proceso a niveles de producción de varios cientos de toneladas de L-metionina al año, introduciendo una nueva tecnología que usa un reactor enzimático de membrana. El reactor es operado en continuo como un reactor de reciclaje, donde la enzima en estado soluble es retenida por una membrana de ultrafiltración de fibras huecas (Bommarius & Riebel, 2004). Actualmente el biocatalizador se produce en grandes cantidades y su estabilidad operacional es alta, por lo que este proceso ha demostrado ser altamente eficiente, especialmente a gran escala (Aehle, 2003). Un avance importante en este proceso es la racemización selectiva *in situ* del *N*-acil aminoácido realizada por la racemasa. Este paso mejora dramáticamente el proceso de la acilasa eliminando el costo de racemización térmica y los pasos de separación (figura 5.16). Además de que el proceso convencional se realizaba a pH 3 y entre 80 y 100°C y el novedoso proceso enzimático se realiza a pH 7-8 y entre 25 y 40°C (Eley, Pines et al, 1979). El descubrimiento de la D-aminoacilasa permite también la obtención de D aminoácidos utilizando este mismo proceso e instalaciones.

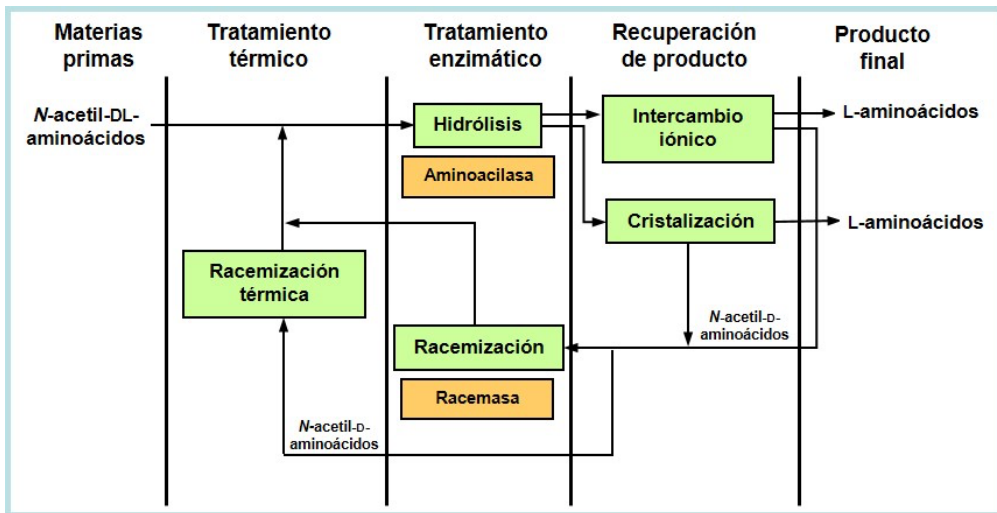


Figura 5.16. Diagrama del proceso de producción con aminoacilasa para la obtención de L-aminoácidos.

Productividad del biocatalizador

Si se añade una gran cantidad de biocatalizador a un sustrato en solución, se obtienen mejores resultados que si se añade poco catalizador. Sin embargo, para que un catalizador pueda considerarse como tal, es necesario adicionarlo al proceso en cantidades muy pequeñas. Mientras menor sea la cantidad de catalizador que se requiere añadir para obtener el mismo resultado, mejor es su desempeño. Este desempeño depende del máximo uso que se le puede dar a un biocatalizador, para una reacción en especial y bajo condiciones definidas, a través del número de reacciones moleculares o ciclos de reacción que se desarrollan en el sitio activo de la enzima hasta que decae su actividad o termina su vida útil, lo que se conoce como número de recambio de una enzima (*turnover number* – TON) (Bommarius & Riebel, 2004, Hagen 2006).

$$TON = \frac{\text{Cantidad de producto}}{\text{Cantidad de biocatalizador}} \quad (5.87)$$

El número de recambio no se usa frecuentemente en biocatálisis, posiblemente porque la masa molecular del biocatalizador se debe conocer y tener en cuenta para obtener el número adimensional, pero es un criterio decisivo, junto con la frecuencia de recambio (*turnover frequency* – TOF) y la selectividad, para evaluar un catalizador en un proceso catalítico (Bommarius & Riebel, 2004). La frecuencia de recambio cuantifica la actividad específica de un centro catalítico para una reacción en especial y bajo condiciones definidas, a través del número de reacciones moleculares o ciclos catalíticos que ocurren en el sitio catalítico por unidad de tiempo.

$$TOF = \frac{\text{Velocidad volumétrica de la reacción}}{\text{Número de centros catalíticos / volumen}} = \frac{\text{moles}}{\text{volumen} \cdot \text{tiempo}} \frac{\text{volumen}}{\text{moles}} = \text{tiempo}^{-1} \quad (5.88)$$

La relación entre TOF y TON se esquematiza en la ecuación siguiente:

$$TON = TOF[\text{tiempo}^{-1}] \cdot \text{vida media del biocatalizador}[\text{tiempo}] \quad (5.89)$$

Para aplicaciones industriales, el TON está en el rango de $10^6 - 10^7$, y el TOF en $10^3 - 10^7 \text{ s}^{-1}$ (Hagen, 2006).

A través del número de recambio del catalizador se puede obtener la productividad del mismo, expresada a como *número de productividad* (PN).

$$PN = \frac{\text{Masa de producto}}{\text{Unidad de biocatalizador} \cdot \text{tiempo}} \quad (5.90)$$

No se tiene que perder de vista que actualmente existen varias estrategias para aumentar la productividad del biocatalizador en un proceso; la más tradicional es a través de reutilizar la enzima o célula inmovilizada, y otra alternativa es a través de modificaciones genéticas (clonación y expresión del correspondiente gen de interés en un organismo huésped) para aumentar la concentración de enzima activa en células usadas como biocatalizadores.

Estabilidad del biocatalizador

Como en todos los procesos catalíticos, la estabilidad del biocatalizador es un criterio clave para analizar la eficiencia económica del proceso. En contraste con la estabilidad a la temperatura o al almacenamiento, los cuales son independientes del proceso, la estabilidad operacional o estabilidad al proceso es decisiva y determinante para el desarrollo del proceso. El valor numérico de la estabilidad operacional se expresa como la cantidad de unidades de enzima gastadas para generar una cantidad definida de producto. Esto se define como número total de recambio (TTN) (Bommarius & Riebel, 2004).

$$TTN = \frac{\text{moles de producto producido}}{\text{moles de biocatalizador gastado}} \quad (5.91)$$

A menudo, cuando la pureza del biocatalizador no se conoce, la estabilidad se puede expresar como el número de consumo de la enzima (e.c.n.).

$$e.c.n. = \frac{\text{Cantidad de preparación de enzima gastada}}{\text{Cantidad de producto generado}} = \frac{\text{g de enzima}}{\text{kg de producto}} \quad (5.92)$$

Esta ecuación se utiliza más comúnmente y permite mostrar fácilmente la contribución del biocatalizador al costo total del proceso (Tramper & Poulsen, 2000).

Las mediciones de estabilidad operacional de las enzimas deben realizarse bajo una concentración constante de sustrato, lo cual se encuentra usando un reactor continuo. Para enzimas inmovilizadas, el uso de un reactor de lecho fijo en flujo pistón es el más adecuado. Para enzimas solubles, un tanque agitado es más ventajoso pero los reactores enzimáticos de membrana también son muy utilizados.

El parámetro relevante para estudiar la estabilidad operacional de las enzimas es el producto de la concentración de la enzima activa ($[E]_{\text{activa}}$) por el tiempo de residencia (τ). Por ejemplo, para un tanque agitado continuo, la ecuación que correlaciona la estabilidad operacional es:

$$\frac{[E]_{\text{activa}} \cdot \tau}{[S_0]} = \frac{x}{r(x)} \tag{5.93}$$

donde:

x es el grado de conversión y

$r(x)$ es la conversión dependiente de la velocidad de reacción

El umbral para considerar suficiente la estabilidad operacional de un biocatalizador depende de la aplicación, así como del rendimiento. Para aplicaciones en síntesis, la TTN debe ser mayor de 10,000; y para procesos a gran escala, se prefieren mayor a 1,000,000.

Mientras el biocatalizador sea activo y estable por más tiempo, menor será su costo por kilogramo de producto. Una de las estrategias para conseguirlo es su reutilización (figura 5.17). La habilidad para reutilizar el biocatalizador ha minimizado los costos a una aceptable fracción del costo de producción total y por tanto ha permitido la producción, económicamente hablando, de compuestos de alto valor que antes no estaban disponibles comercialmente. Un ejemplo son algunos ingredientes para productos de belleza, como el cetilo de ricinoleato, un aditivo que permite el desarrollo de nuevas formulaciones cosméticas al controlar los efectos reológicos producidos por el alcohol cetílico durante el proceso (Veit 2004).

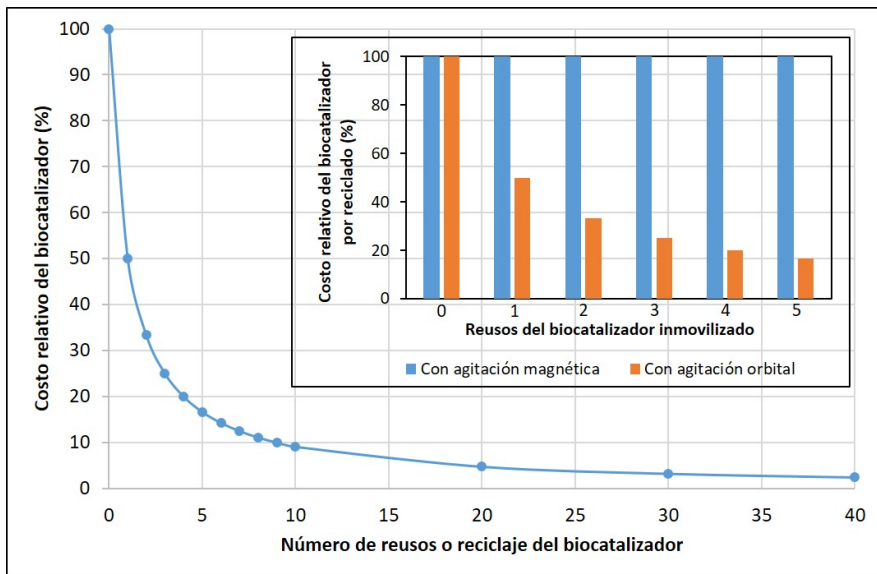


Figura 5.17. Economía del proceso. Reducción de los costos del biocatalizador por reutilización de la enzima (Veit, 2004). Gráfica interior (Diosdado, Chávez *Et al.*, 2016).

En la gráfica de barras dentro de la figura 5.17 se ejemplifica el reciclaje o reutilización del biocatalizador en dos sistemas de reacción a pequeña escala: cuando se usa un sistema con agitación orbital (donde el biocatalizador no sufre daño mecánico y puede recuperarse y reutilizarse) y uno con agitación magnética (donde el agitador magnético después de 3 horas de reacción, pulveriza el biocatalizador dejando sólo un 60% recuperable por lo que es necesario utilizar nuevo biocatalizador al comenzar un lote nuevo de reacción) (Diosdado-Nava, Chávez-Flores et al, 2016). El costo del biocatalizador en la reacción con agitación magnética es siempre el costo total inicial, mientras que utilizando la agitación orbital, el costo disminuye en cada nuevo lote de reacción de forma constante (al 50% del costo inicial cuando se reutiliza una vez, al 33.33% dos veces, al 25% tres reusos y así sucesivamente).

Otra estrategia para mejorar la estabilidad operacional del biocatalizador consiste en identificar o diseñar una enzima óptima para un proceso enzimático específico, con la finalidad de que la vida útil de la enzima en ese proceso sea mayor y por ende, disminuya el costo del biocatalizador. Esta estrategia constituye uno de los retos de la tecnología enzimática moderna. En términos generales, los procesos biocatalíticos sólo pueden llevarse a cabo a escala industrial cuando el costo del biocatalizador es menor al 5-10% de los costos de transformación del sustrato(s) en los producto(s) deseado(s) (Buchholz, Kasche et al, 2012).

Productividad del reactor

En el punto final de un proceso se obtiene el rendimiento máximo o la calidad óptima del producto. Cuando se requiere comparar reactores de distintos tamaños o construcciones, que alcancen los mismos resultados en rendimiento o calidad, se analiza la productividad del reactor a través del parámetro de rendimiento en espacio-tiempo (STY):

$$STY = \frac{\text{Cantidad deseada o generada de producto}}{\text{Volumen del reactor} \cdot \text{tiempo}} = \frac{\text{kg}}{L \cdot h} \quad (5.94)$$

Dado que un incremento en el valor de STY en el mismo reactor es equivalente a un incremento en la velocidad de reacción y por consiguiente una mejoría en el proceso, este parámetro también se utiliza para comparar modificaciones del proceso en el mismo reactor. Algunas de ellas pueden ser:

- Incremento en la concentración de sustrato
- Incremento en la concentración de enzima
- Incremento de la constante catalítica (k_{cat})

El valor mínimo para la productividad de un reactor en base al parámetro *STY* es de 100 g/L-d, un valor que puede deberse más a la falta de solubilidad del sustrato que a la reactividad del biocatalizador. Un proceso biocatalítico bien desarrollado generalmente alcanza valores de *STY* mayores a 500 g/L-d, llegando incluso hasta 1kg/L-d (Tramper & Poulsen, 2000).

Este parámetro también sirve para comparar la producción de compuestos utilizando diferentes configuraciones de reactor.

Algunos ejemplos de procesos altamente productivos incluyen la producción de L-ácido aspártico por la aspartasa inmovilizada; la producción de L-fenilalanina usando una transaminasa o amidasa; la producción de L-*tert*-leucina usando leucina deshidrogenada en un reactor de membrana; la producción de ácido 2-cloropropiónico por una reacción de esterificación catalizada por lipasas y la producción de 1-feniletilamina por una reacción estereoselectiva también catalizada por lipasas (Rozzell, 1999).

Futuro y perspectivas de los procesos biocatalíticos

Actualmente los procesos biocatalíticos, por lo general, no están limitados por la tecnología disponible o la naturaleza de los sustratos y los productos. En cambio, la factibilidad del desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos, a menudo está siendo determinada por la disponibilidad de los biocatalizadores (Schmid, Dordick et al, 2001).

El reto principal de la Biocatálisis es obtener biocatalizadores con propiedades nuevas y/o mejoradas de los que se pueda disponer para ser aplicados en un sinnúmero de procesos de las diferentes industrias como una alternativa para nuevos procesos limpios y sustentables.

En el ámbito internacional, institutos de investigación y empresas biotecnológicas (Novozymes, DSM, DuPont, AB Enzymes y otras) están siguiendo nuevas estrategias para la obtención de nuevos biocatalizadores. Algunas de ellas son el mejoramiento de enzimas a través de cambios estructurales mediante técnicas de biología molecular como evolución dirigida (Arnold & Volkov, 1999), diseño de proteínas (Polaina & MacCabe, 2007) o mutagénesis (Arnold & Georgiou, 2003), la búsqueda de nuevas enzimas provenientes de microorganismos no cultivables de diversos ambientes a través de la construcción de librerías metagenómicas (Schloss & Handelsman, 2003; Ferrer, Golyshina et al, 2005; Ferrer, Martínez et al, 2016) y el desarrollo de nuevas técnicas de inmovilización (Mateo, Palomo et al, 2007; Sheldon, 2007) y medios de reacción (van Rantwijk & Sheldon, 2007).

En México existen aún pocas industrias productoras de enzimas (ENMEX, Fermic, Chr. Hansen de México), sin embargo cada vez hay mayor demanda y tal vez, ojalá, en algún futuro, las empresas transnacionales o nacionales inicien labores de investigación y desarrollo sobre enzimas en nuestro país.

Problema 5.1 Cinética enzimática y biocatálisis.

Ejemplo de aplicación de lacasas en la industria textil

*María Dolores Reyes Duarte**

*Humberto García Arellano***

La industria textil es el sector económico que tiene como fin la producción de fibras sintéticas y naturales y cualquier otro producto destinado a la producción de ropa y tejidos. Actualmente, esta industria abarca una gran cantidad de procesos como el anudado de alfombras (*tufting*), la elaboración de tejidos de punto o malla, el enfurtido, así como el hilado a partir de fibras sintéticas, naturales y el acabado y tinción de los tejidos (Lee Ivester & Neefus, 2001). En esta industria, las enzimas se pueden aplicar tanto al tratamiento de fibras proteicas naturales (lana y seda), fibras celulósicas (algodón, lino y cáñamo) y en fibras sintéticas. Las enzimas encuentran aplicación en las fases de hilado, teñido y acabado de los tejidos con el objetivo de limpiar la superficie del material, reducir las pilosidades y mejorar la suavidad. Entre las enzimas que encuentran aplicación en esta rama de la industria se encuentran las α -amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas, catalasas, peroxidases y lacasas.

Un proceso textil interesante donde las enzimas tienen un uso relevante es en la producción de tela Denim (mezclilla), con la que se confeccionan los jeans (Kirk, Borchert et al, 2002).

Dentro de este proceso, las lacasas, participan en el proceso de decoloración o blanqueo de la tela a través de la oxidación del colorante índigo.

* Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa, México. dreyes@correo.cua.uam.mx

** Departamento de Ciencias Ambientales, UAM-Lerma, México. h.garcia@correo.ler.uam.mx

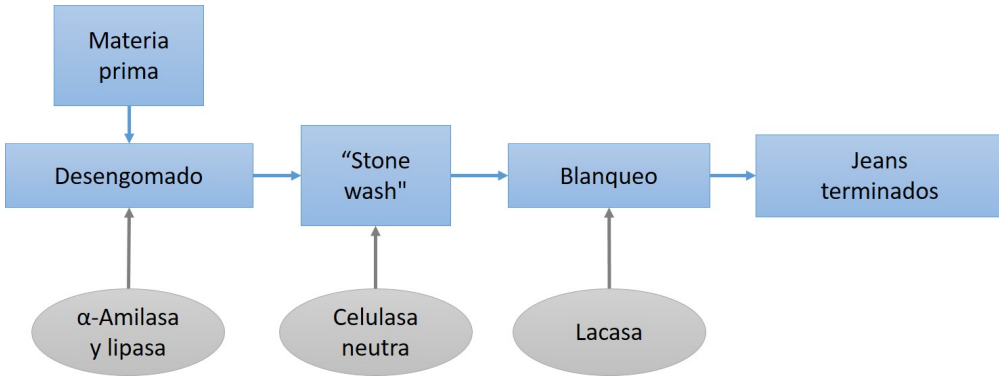


Figura 5.18. Esquema de proceso de producción de tela para jeans (tela Denim). Modificada de (Kirk, Borchert et al, 2002; Torres & Sandoval, 2015).

Las lacasas (Bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2), pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre. Son fenol oxidasas con una masa aproximada de 70 kDa producidas por algunos hongos basidiomicetos conocidos como hongos de la putrefacción blanca. En la naturaleza, estas enzimas están involucradas en la degradación de la lignina, que constituye uno de los principales componentes de la madera y es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas.

Las lacasas también tienen aplicación en el tratamiento de los efluentes generados por los procesos textiles. La industria textil es una de las mayores productoras de efluentes líquidos. Estos efluentes son potencialmente tóxicos y contienen productos no biodegradables que suelen ser resistentes a la destrucción por métodos de tratamiento físico-químico. Los efluentes textiles poseen un elevado contenido de colorantes (10-15% de los colorantes no fijados son desechados en los efluentes) y aditivos que generalmente son compuestos orgánicos de estructuras complejas, poco biodegradables. Las lacasas son capaces de oxidar y detoxificar un gran número de compuestos, con la reducción acoplada de oxígeno molecular a agua. Debido a esta característica, estas enzimas encuentran aplicación como biocatalizadores industriales en el tratamiento de los efluentes textiles, en la deslignificación y blanqueo de la pulpa de papel, y en la biorremediación de residuos industriales. Aunque las lacasas oxidan preferencialmente sustratos fenólicos, el tipo y número de sustratos que pueden ser oxidados por esta enzima se ve incrementado mediante la adición de ciertos compuestos denominados mediadores, como el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) y el HBT (1-hidroxibenzotriazol). Por esta razón, muchas preparaciones enzimáticas comerciales incluyen el sistema lacasa-mediador redox. Otras formulaciones integran, además de las lacasas, celulasas. Esto les permite agrupar las etapas *stone wash* y blanqueo en una sola, donde variando la dosis o el tiempo de tratamiento es posible obtener diferentes tonos y terminaciones de producto (Rodríguez, 2012) (ver figura 5.18).

El uso de estas preparaciones tiene varias ventajas como: a) hacer más eficiente el proceso, b) brindar un terminado superior de la mezclilla deslavada sin afectar los productos que tengan Lycra u otro elástico ya que no hay desgaste mecánico, c) tener un fácil control de proceso y, finalmente, d) hacer un proceso ambientalmente más sustentable al desplazar el uso del hipoclorito y eliminar los residuos clorados de esta industria (Tramper & Poulsen, 2000).

En este problema se presentan los cálculos para estimar la actividad enzimática de una lacasa y para la determinación de sus constantes cinéticas. Esta metodología puede aplicarse al análisis de cualquier enzima que se ajuste al modelo de *Michaelis-Menten*.

Objetivo del problema

Las preparaciones comerciales de lacasa generalmente utilizan la enzima proveniente de *Trametes versicolor*. La empresa “Bluejeans” utiliza la formulación comercial Denim-zyme que contiene lacasa de *Trametes versicolor* con buffer y mediador, y tiene una actividad enzimática de 10 UI/g. Sin embargo, la empresa está incursionando en la biotecnología y quiere producir su propia preparación enzimática, así que obtiene una nueva lacasa aislada del hongo *Pleurotus ostreatus*, y desarrolla una formulación comercial (Biodenim) con una actividad enzimática de 200 nkat/g. Tu trabajo es analizar si esta enzima es competitiva tanto en eficiencia de uso como en costo, con la preparación tradicionalmente usada, Denim-zyme. Para ello, Bluejeans te pide que obtengas los parámetros cinéticos de la nueva enzima como solución de proteína pura en buffer acetato 50 mM pH 4.5 a una concentración de 0.314 $\mu\text{g/mL}$ y con una actividad de 180 nkat/mg de proteína, y la evaluación de la preparación enzimática Biodenim. Te indican que para el proceso de decoloración utilizan una dosis de 1.5% de Denim-zyme (Novozymes, 2005), añadida al sistema de reacción (“licor de reacción”) y que los costos de Denim-zyme y Biodenim son de 3500 dls el barril de 300 kg, y 3700dls/300 kg, respectivamente.

Las actividades a realizar son:

- i. determinar los parámetros cinéticos de la lacasa de *P. ostreatus* en la oxidación de ABTS (K_M , V_{max} , k_{cat} y eficiencia catalítica, k_{cat}/K_M);
- ii. calcular la dosis requerida con el biocatalizador Biodenim;
- iii. calcular el costo por dosis de ambos biocatalizadores (Denim-zyme y Biodenim), para determinar si realmente puede ser competitiva también en costo.

Metodología

La reacción de oxidación del ABTS se muestra en el siguiente esquema:

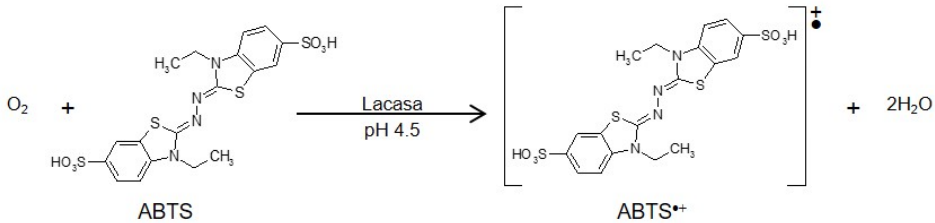


Figura 5.19. Reacción de oxidación del ABTS por una lacasa.

En esta reacción, la lacasa genera un radical catiónico (ABTS^{•+}) y el oxígeno molecular es reducido a agua. El radical catiónico del ABTS presenta absorción a 420 nm (tiene una coloración verde-azul) lo que facilita su seguimiento por espectrofotometría. El coeficiente de absorción milimolar reportado para el ABTS^{•+} es $\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contiene el sustrato, en las concentraciones indicadas en la tabla 5.3, disuelto en buffer de acetato 50 mM, pH 4.5. La reacción se inicia con la adición de 10 μL de una solución de lacasa (3.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentración final en el ensayo). El volumen final de la reacción es 1 mL. El progreso de la reacción se siguió midiendo la absorbancia a 420 nm cada 20 segundos durante 160 segundos. Los datos obtenidos se presentan en la 5.3.

Tabla 5.3. Datos obtenidos de la cinética de reacción de la lacasa.

ABTS (mM)	Absorbancia a 420 nm a tiempo (s):								
	0	20	40	60	80	100	120	140	160
0.007	0.06	0.09	0.12	0.13	0.15	0.18	0.21	0.22	0.25
0.010	0.14	0.15	0.18	0.22	0.24	0.28	0.31	0.35	0.38
0.025	0.22	0.30	0.40	0.47	0.56	0.67	0.73	0.80	0.90
0.050	0.19	0.35	0.60	0.68	0.84	1.00	1.16	1.32	1.49
0.100	0.24	0.47	0.70	0.93	1.18	1.42	1.70	1.90	2.10
0.200	0.34	0.63	0.95	1.26	1.58	1.88	2.21	2.53	2.84
0.500	0.31	0.89	1.56	2.13	2.75	3.45	3.96	4.62	5.20
1.00	0.35	1.32	1.89	2.73	3.38	4.22	4.91	5.85	6.69
1.50	0.34	1.42	2.31	3.15	3.93	4.8	5.69	6.48	7.4

A partir de los datos de la tabla 5.3 se puede resolver el problema planteado. La estrategia general consiste en determinar las velocidades iniciales (v_0) a las diferentes concentraciones de ABTS^{•+}. Posteriormente se grafican los datos de v_0 en función de la concentración de sustrato para verificar que la cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (ecuación 5.95). Los datos cinéticos se obtienen a partir de la transformación de los datos

de acuerdo al modelo de Lineweaver-Burk (ecuación 5.96), esto es, graficando $1/v_0$ vs $1/[ABTS]$, o bien a partir del ajuste de la curva de Michaelis-Menten mediante el método de mínimos cuadrados.

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat} \cdot [E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (5.95)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5.96)$$

Solución

a) Cálculos para determinar los parámetros cinéticos de la lacasa de *P. ostreatus* en la oxidación de ABTS (K_M , V_{max} , k_{cat} y eficiencia catalítica, k_{cat}/K_M)

Para obtener los datos de velocidad inicial (v_0) se grafican los datos de absorbancia a 420 nm vs tiempo (figura 5.20). La velocidad inicial se debe determinar en la zona lineal de la gráfica y los datos se deben ajustar a una línea recta. La pendiente resultante en este ajuste es igual a la velocidad inicial de la reacción expresada como el cambio en la absorbancia por segundo, $\Delta UAbs/s$ (tabla 5.4).

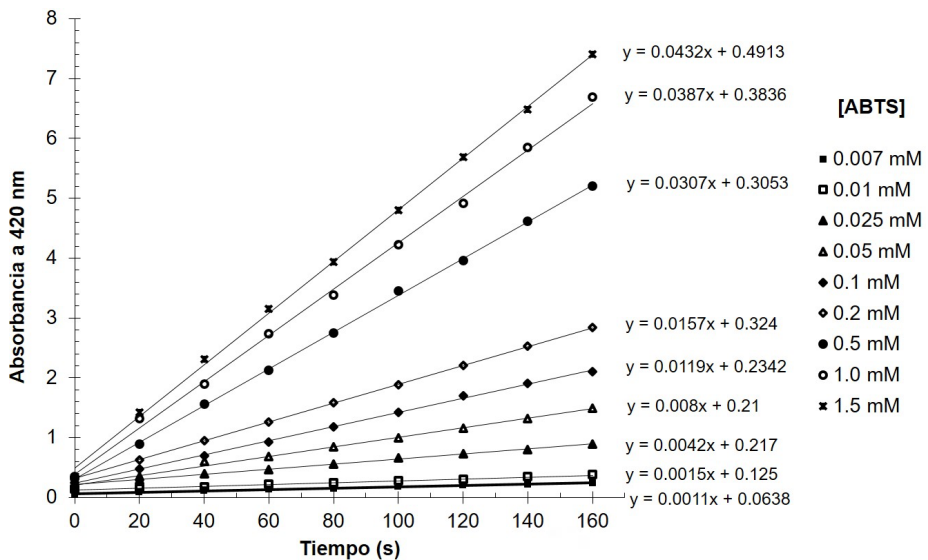


Figura 5.20. Cinética de oxidación del ABTS⁺⁺ por la lacasa.

Para obtener los datos cinéticos expresaremos los datos de velocidad como $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Para esto, primero es necesario transformar los datos de $\Delta\text{UAbs}/\text{s}$ a $\Delta\text{UAbs}/\text{min}$, para posteriormente transformarlos a las unidades $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando la ecuación de Lambert-Beer. De acuerdo a esta ecuación, la absorbancia es proporcional a la concentración de un compuesto determinado, por tanto es posible estimar el cambio en la concentración de dicho compuesto a partir de la relación:

$$v_0 = \frac{dC_{\text{ABTS}^{*+}}}{dt} = \frac{\Delta\text{UAbs} / \text{min}}{\epsilon \cdot d} \quad (5.97)$$

En donde:

v_0 Es la velocidad de aparición de producto ($\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$);

$dC_{\text{ABTS}^{*+}}/dt$ Representa el cambio en la concentración del ABTS^{*+} ;

ϵ Es el coeficiente de absorción molar del ABTS^{*+} ($36 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 420 nm)

d Es la longitud del paso de la luz. Generalmente es 1 cm para celdas de espectrofotómetro.

Aplicando esta ecuación a los datos de la tabla 5.3 se obtienen las velocidades iniciales expresadas como $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Los datos se presentan en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Velocidad inicial en la oxidación de ABTS por la lacasa.

ABTS (mM)	v_0 $\Delta\text{UAbs}\cdot\text{s}^{-1}$	v_0 $\Delta\text{UAbs}\cdot\text{min}^{-1}$	v_0 ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
0.007	0.0011	0.066	0.002
0.010	0.0015	0.090	0.003
0.025	0.0042	0.252	0.007
0.050	0.0080	0.480	0.013
0.100	0.0119	0.714	0.020
0.200	0.0157	0.942	0.026
0.500	0.0300	1.800	0.050
1.00	0.0387	2.322	0.065
1.50	0.0432	2.592	0.072

Graficando v_0 contra la concentración de ABTS se obtiene la gráfica de Michaelis-Menten (figura 5.21). Los parámetros cinéticos se pueden determinar directamente a partir de la gráfica de Michaelis-Menten.

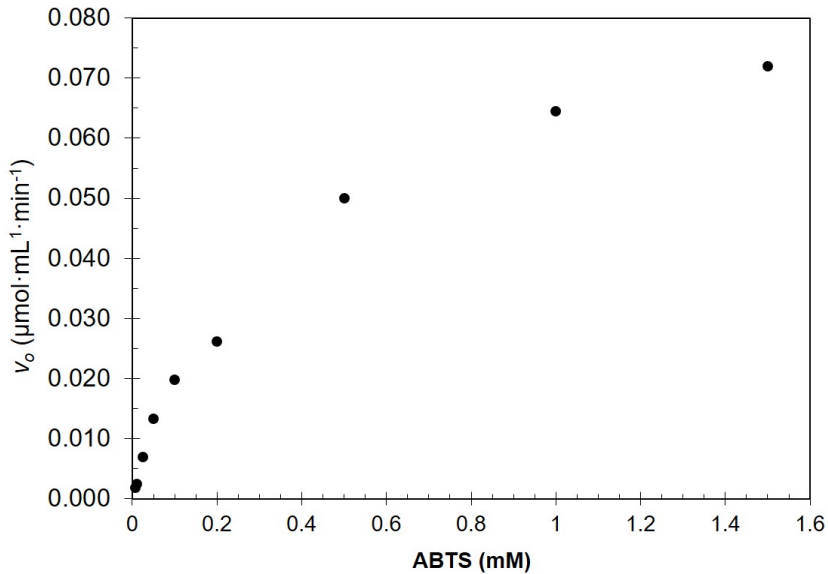


Figura 5.21. Gráfica de Michaelis-Menten para la oxidación de ABTS por la lacasa.

Sin embargo, este método es poco preciso y en su lugar es común determinar los parámetros a partir de una gráfica de Lineweaver-Burk. Para ello es necesario obtener los valores $1/v_0$ y graficarlos contra $1/[\text{ABTS}]$ (tabla 5.5). A partir de los valores de la ordenada al origen ($1/v_{max}$) y de la pendiente (K_M/v_{max}) obtenidos mediante el ajuste lineal de esta ecuación es posible obtener los valores de K_M y v_{max} (figura 5.22).

Tabla 5.5. Valores inversos de concentración y velocidad.

$1/[\text{ABTS}]$ (mM^{-1})	$1/v_0$ ($\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$)
143	545
100	400
40	143
20	75
10	50
5	38
2	20
1	16
0.67	14

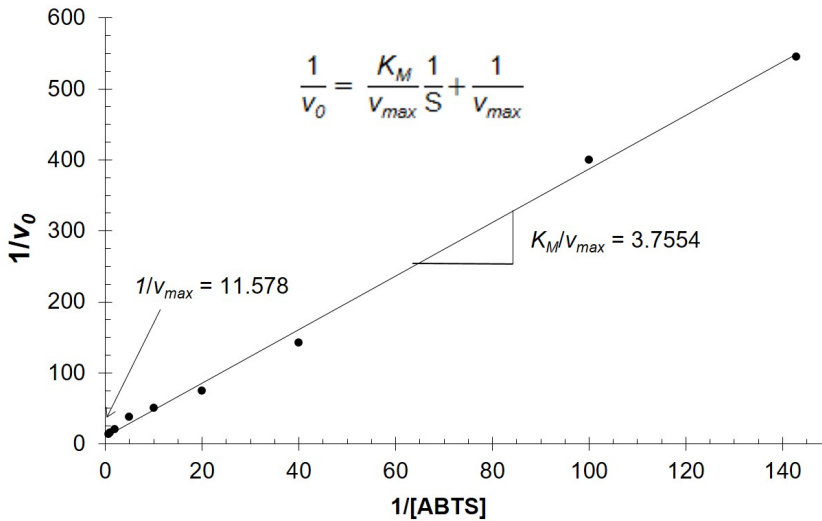


Figura 5.22. Gráfica de Lineweaver-Burk para la oxidación del ABTS por la lacasa.

El ajuste lineal arroja la ecuación siguiente:

$$y = 3.57554x + 11.5778$$

con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.9978$. De aquí, sustituyendo en la ecuación 2, se tiene que $1/v_{max} = 11.5778$ y $v_{max} = 0.0863 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. De la misma manera, $K_M/v_{max} = 3.7554$ y $K_M = 0.309 \text{ mM} = 3.09 \times 10^{-4} \text{ M}$.

La actividad específica de la enzima se determina en condiciones de saturación de sustrato, esto es, en concentraciones de sustrato que equivalen al menos a 5 veces la K_M (Illanes, Wilson et al, 2014). Para estimar la actividad específica podemos utilizar el dato de v_0 obtenida a 1.5 mM de ABTS. Bajo estas condiciones asumimos que estamos bajo condiciones de saturación y que la enzima trabaja a su velocidad máxima v_{max} .

A partir de los datos iniciales del problema, sabemos que la concentración de enzima utilizada en el ensayo fue de $3.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Si asumimos una masa molecular de 70 kDa para la lacasa, la concentración de esta enzima en el ensayo es:

$$\frac{3.14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}}{70,000 \mu\text{g}\cdot\mu\text{mol}^{-1}} = 44.8 \times 10^{-6} \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$$

A partir del desarrollo de la ecuación de Michaelis-Menten sabemos que:

$$v_{max} = k_{cat} \cdot [E]_T \quad (5.98)$$

De tal forma que podemos obtener el valor de la actividad específica (k_{cat}) a partir de la expresión:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} = \frac{0.072 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}}{44.8 \times 10^{-6} \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}} = 1,605.1 \text{ min}^{-1} = 26.8 \text{ s}^{-1} \quad (5.99)$$

Finalmente, la eficiencia catalítica se obtiene dividiendo:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{26.8 \text{ s}^{-1}}{3.09 \times 10^{-4} \text{ M}} = 8.67 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \quad (5.100)$$

b) Conociendo que la actividad enzimática puede expresarse como:

$$1 \text{ katal} = \frac{1 \text{ mol } S}{\text{seg}} \quad (5.101)$$

$$1 \text{ UI} = \frac{1 \mu\text{mol } S}{\text{min}} \quad (5.102)$$

Donde:

UI significa unidades internacionales

Si se requiere 1.5% del biocatalizador Denim-zyme para el proceso, entonces la dosis es de:

$$15 \left[\frac{\text{g biocatalizador}}{\text{L licor de reacción}} \right] 10 \left[\frac{\text{UI}}{\text{g biocatalizador}} \right] = 150 \left[\frac{\text{UI de Denimzyme}}{\text{L licor de reacción}} \right] \quad (5.103)$$

El biocatalizador Biodenim tiene una actividad de 200nkat/g, por lo tanto, convirtiendo a UI, se tiene:

$$200 \left[\frac{\text{nkat}}{\text{g}} \right] = 200 \left[\frac{\text{nmol } S}{\text{seg}} \right] \left[\frac{\mu\text{mol } S}{1000 \text{ nmol } S} \right] \left[\frac{60 \text{ seg}}{1 \text{ min}} \right] = 12 \left[\frac{\text{UI}}{\text{g Biodenim}} \right] \quad (5.104)$$

Si se requieren 150 UI de biocatalizador por dosis, entonces:

$$\frac{150 \left[\frac{UI}{dosis} \right]}{12 \left[\frac{UI}{g \text{ Biodenim}} \right]} = 12.5 \left[\frac{g \text{ biocatalizador Biodenim}}{dosis} \right] \quad (5.105)$$

Por lo tanto, la dosis requerida de la nueva formulación enzimática Biodenim es de 1.25%.

c) El costo por dosis de la formulación Denim-zyme se obtiene de la siguiente forma:

$$15 \left[\frac{g \text{ biocatalizador}}{dosis} \right] 11.67 \left[\frac{dlls}{kg \text{ biocatalizador}} \right] \left[\frac{1 kg}{1000 g} \right] = 0.175 \left[\frac{dlls}{dosis} \right] \quad (5.106)$$

Calculando de la misma forma, el costo por dosis de la nueva formulación Biodenim es:

$$12.5 \left[\frac{g \text{ biocatalizador}}{dosis} \right] 12.33 \left[\frac{dlls}{kg \text{ biocatalizador}} \right] \left[\frac{1 kg}{1000 g} \right] = 0.154 \left[\frac{dlls}{dosis} \right] \quad (5.107)$$

Por lo tanto, el costo de la nueva formulación Biodenim es más económico que Denim-zyme y puede ser un producto competitivo.

Problema 5.2 Uso de enzimas alimentarias

*Rodolfo Quintero Ramírez**

*Agradecimientos a la Ing. Martha Almazán
por la colaboración en la elaboración de este problema.*

Planteamiento del problema

Una abuelita desea invitar a su familia a cenar pero tiene un problema, varios de sus hijos y nietos son intolerantes a la lactosa y por tanto debe pensar en preparar alimentos que no la contengan. Sin embargo, solo tiene tres litros de leche natural y debe hacer algo para evitar que sus familiares se enfermen. Recuerda que hace algunas semanas una amiga le regaló unas pastillas que contienen lactasa y le ha quedado una botella del producto con una pastilla. La caja que lo contiene dice: *Enzyme Lactase*. 9,000 units de lactasa en 120 pastillas pero no sabe usarlo. No obstante, recuerda que tiene un nieto que estudia Ingeniería Biológica y recurre a él, haciéndole la siguiente pregunta: Si agrego la pastilla de lactasa a los tres litros de leche, ¿En cuánto tiempo puedo ofrecerla a los invitados si la leche está a temperatura ambiente (20°C)?

Respuesta

El nieto, lo primero que se le ocurre es saber porque la lactasa se utiliza para evitar la intolerancia a la lactosa. Encuentra que la lactasa cataliza la siguiente reacción (Figura 5.24):

* Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-Cuajimalpa, México. quintero@correo.cua.uam.mx

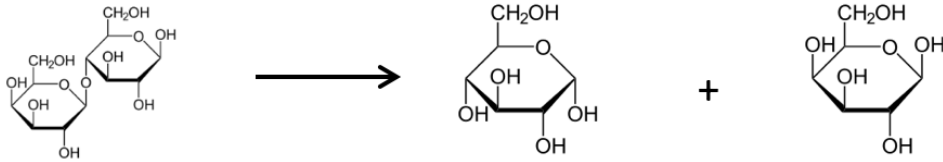


Figura 5.23. Reacción catalizada por la lactasa.

También recuerda que además a la lactasa se le conoce como β -galactosidasa y que 1 unidad significa que se obtiene 1 μmol de producto hidrolizado a condiciones estándar.

Por otra parte, busca en la literatura qué cantidad de lactosa hay en leche; y encuentra que en 100g de leche hay 4.7 g de lactosa y la leche tiene una gravedad específica de 1.073 a 1.040 (20°C). Con esa información calcula:

- Una pastilla tiene 9000U/120 pastillas = 75 U/pastilla, o sea puede hidrolizar 75 $\mu\text{mol}/\text{min}$.
- El peso molecular de la lactosa es 342.3 g/mol y en 3 litros de leche hay: 150 g de lactosa.

Solución

Se calcula el número de μmol de lactosa presente en la leche:

$$150 \text{ g} / 342.3 \text{ g/mol} \times 10^6 = 437,318 \text{ } \mu\text{moles} \quad (5.108)$$

O sea que si agrega una pastilla y la leche está a 20°C, entonces requeriría $437,318 \text{ } \mu\text{moles} / 75 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min} = 5831$ minutos para degradar la lactosa totalmente o sea 97.18 horas. Este resultado es claramente inadecuado para la abuelita y por tanto decide buscar una alternativa.

Recuerda que la actividad enzimática depende de la temperatura (Blanch & Clark, 1997) y decide buscar una alternativa.

Solución

De acuerdo a la literatura científica la velocidad de reacción depende de la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot \exp\left(\frac{-E_A}{R T}\right) \quad (5.109)$$

donde,

- k es la constante de velocidad;
- R es la constante de gases ideales;
- A es el factor de frecuencia;
- E_A es la energía de activación de la reacción;
- T es la temperatura en grados Kelvin.

El nieto busca la energía de activación para la reacción de hidrólisis de la lactosa, encontrando los siguientes datos (García, Quintero et al, 1993; Lee, 1996; Blanch & Clark, 1997):

Tabla 5.6. Relación entre los valores de temperatura y v_{max} .

T (°C)	v_{max}
20	4.50
30	8.65
35	11.80
40	15.96
45	21.36

Con esta información procede a calcular la energía de activación y para ello rescribe la ecuación de Arrhenius en una forma más fácil de manejar:

$$\ln k = -\frac{E_A}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \quad (5.110)$$

Y ahora la aplica para las dos temperaturas

$$\frac{Vmax_{30}}{Vmax_{45}} = \frac{A e^{-E_A/R(303)}}{A e^{-E_A/R(318)}} \quad (5.111)$$

Resolviendo la ecuación anterior:

$$\frac{Vmax_{30}}{Vmax_{45}} = e^{-\frac{E_A}{R(303)} + \frac{E_A}{R(318)}} \quad (5.112)$$

$$\frac{Vmax_{30}}{Vmax_{45}} = e^{\frac{E_A}{R} \left(-\frac{1}{318} + \frac{1}{303} \right)} \quad (5.113)$$

$$\frac{Vmax_{30}}{Vmax_{45}} = e^{\frac{E_A}{R} \left(-\frac{303-318}{318*303} \right)} \quad (5.114)$$

Ahora utiliza $R = 1.9871 \text{ cal mol}^{-1} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$ y despeja E_A obteniendo el valor de $11525.5 \text{ cal mol}^{-1}$.

Con esta información calcula el tiempo que tardaría en hidrolizar totalmente a la lactosa para diferentes temperaturas.

Tabla 5.7. Tiempo que se requiere para hidrolizar la lactosa a diferentes temperaturas.

T (°C)	t (min)
20	5831
40	1653.9
60	620.8
80	242.5
90	127.9

Al observar que se requiere elevar mucho la temperatura encuentra que no es factible hidrolizar la lactosa de los tres litros de leche y se le ocurre proponerle a la abuelita que solo le agregue la pastilla de lactasa a un litro de leche después de haberla hervido.

¿Por qué cree que le propuso eso?

Nomenclatura

a	Orden de reacción del reactivo A
A	Reactivo A
[A]	Concentración del reactivo A
[A] ₀	Concentración inicial del reactivo A
b	Orden de reacción del reactivo B
B	Reactivo B
[B]	Concentración del reactivo B
[B] ₀	Concentración inicial del reactivo B
E	Enzima
<i>e.c.n.</i>	Número de consumo de una enzima
[E]	Concentración de enzima libre
[E] _{activa}	Enzima activa
[E] _T	Concentración de enzima total
ES	Complejo enzima-sustrato
[ES]	Concentración de complejo enzima-sustrato
k	Constante de velocidad de reacción
k_1	Constante de segundo orden de formación del complejo enzima sustrato
k_{-1}	Constante de primer orden de formación del complejo enzima sustrato para liberar sustrato y enzima
k_2	Constante de primer orden de formación del complejo enzima sustrato para liberar producto y enzima
$k[A]$	Constante aparente de pseudo primer orden en presencia de un exceso de reactivo A
$k[B]$	Constante aparente de pseudo primer orden en presencia de un exceso de reactivo B

k_{cat}	Constante catalítica
k_{cat}/K_M	Eficiencia catalítica
K_{eq}	Constante de equilibrio complejo enzima-sustrato
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_s	Constante de disociación del complejo enzima-sustrato
P	Producto
[P]	Concentración de producto
PN	Número de productividad
$r(x)$	Conversión dependiente de la velocidad de reacción
S	Sustrato
STY	Productividad del reactor (rendimiento espacio-tiempo)
[S]	Concentración de sustrato
[S] ₀	Concentración inicial de sustrato
$t_{1/2}$	Vida media
TOF	Frecuencia de recambio
TON	Número de recambio de una enzima
TTN	Número total de recambio
v	Velocidad de reacción
v_0	Velocidad inicial
v_{max}	Velocidad máxima
x	Grado de conversión
y	Rendimiento de producto
σ	Selectividad
τ	Tiempo de residencia

Bibliografía

- Textile laundry DeniBleach. Application sheet.* Recuperado de: 2/11/2016, http://www.blychem.mu/downloads/Denilite_II_S_-_Application_Sheet.pdf.
- Enzymes Market Size & Share, Global Industry Report Summary, 2024.* Recuperado de: 15/Feb/2017, from <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.
- Industrial Enzymes Market.* Recuperado de: 15/02/2017, <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/industrial-enzymes.asp>.
- Aehle, W. (2003). *Enzymes in industry: production & applications.* Weinheim, Wiley-VCH.
- Arnold, F. H. & G. Georgiou (2003). *Directed enzyme evolution: screening & selection methods.* Totowa, N.J., U.S.A.: Springer Science & Business Media.
- Arnold, F. H. & A. A. Volkov (1999). *Directed evolution of biocatalysts.* Current opinion in chemical biology 3(1): pp. 54-59.
- Ballesteros, A., F. Plou, M. Alcalde, M. Ferrer, H. Garcia-Arellano, D. Reyes-Duarte & I. Ghazi (2007). *Enzymatic Synthesis of Sugar Esters & Oligosaccharides from Renewable Resources. Biocatalysis in the pharmaceutical & biotechnology industries.* pp. 463-488.
- Blanch, H. W. & D. S. Clark (1997). *Biochemical engineering.* New York, U.S.A.: Marcel Dekker, Inc.
- Bommarius, A. S. & B. Riebel (2004). *Biocatalysis.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Buchholz, K., V. Kasche & U. T. Bornscheuer (2012). *Biocatalysts & enzyme technology.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Charnock, S. J. & B. V. McCleary. (2017). *Enzymes: Industrial & Analytical Applications.* Recuperado de: 15/02/2017, https://www.megazyme.com/docs/default-source/analytical-applications-downloads/enzymes_industrial_and_analytical_appliation_eng.pdf?sfvrsn=4.
- Cheetham, P. S. J. (1998). *What makes a good biocatalyst?* Journal of Biotechnology 66: pp. 3-10.

- Cornish-Bowden, A. (2013). *The origins of enzyme kinetics*. FEBS letters 587(17): pp. 2725-2730.
- Davison, B. H., J. W. Barton & G. R. Petersen (1997). *Nomenclature & methodology for classification of nontraditional biocatalysis*. Biotechnology Progress 13(5): pp. 512-518.
- Diosdado-Nava, C., L. F. Chávez-Flores, M. Morales & D. Reyes-Duarte (2016). *Producción de monoésteres de lactulosa*. (Proyecto terminal, Ingeniería Biológica). UAM Cuajimalpa. México, CDMX.
- Eley, D. D., H. Pines & P. B. Weisz (1979). *Advances in Catalysis*. London, UK.: Academic Press, Inc.
- Fernández-Arrojo, L., M.-E. Guazzaroni, N. López-Cortés, A. Belouqui & M. Ferrer (2010). *Metagenomic era for biocatalyst identification*. Current opinion in biotechnology 21(6): pp. 725-733.
- Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V. A. Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis & A. Neef (2005). *Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora*. Environmental Microbiology 7(12): pp. 1996-2010.
- Ferrer, M., M. Martínez-Martínez, R. Bargiela, W. R. Streit, O. V. Golyshina & P. N. Golyshin (2016). *Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status & future trends*. Microbial biotechnology 9(1): 22-34.
- García Garibay, M., R. Quintero Ramírez & A. López-Munguía (1993). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa Noriega.
- Giorno, L. & E. Drioli (2000). *Biocatalytic membrane reactors: applications & perspectives*. Trends in biotechnology 18(8): pp. 339-349.
- Grunwald, P. (2014). *Biocatalysts: Global Market, Industrial Applications, Aspects of Bio-transformation Design, & Societal Challenges*. Industrial Biocatalysis, Pan Stanford: pp. 1-32.
- Hagen, J. (2006). *Industrial catalysis a practical approach*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Handelsman, J. (2005). *Sorting out metagenomes*. Nature biotechnology 23(1): pp. 38-39.

- Hernández Guerrero, M., R. López Simeon, H. I. Beltrán Conde, G. Viguera Ramírez, J. Campos Terán, D. Reyes Duarte & G. Sandoval Fabián (2016). *Sustentabilidad: una visión multidisciplinaria*. E. Peñalosa Castro & R. Quintero y Ramírez. México, CDMX, UAM: 313-328.
- Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: principles & applications*, Springer Science & Business Media.
- Illanes, A., L. Wilson & C. Vera (2014). *Problem solving in enzyme biocatalysis*. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 318.
- IUBMB. (2005). *ExplorEnz. The Enzyme Database*. Recuperado de: 15-02-2017, <http://www.enzyme-database.org/class.php>.
- Kirk, O., T. V. Borchert & C. C. Fuglsang (2002). *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology 13(4): pp. 345-351.
- Laidler, K. J. (1997). *A brief history of enzyme kinetics*. New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner & the Growth of Biochemical Knowledge, Valencia, Spain: Universitat de Valencia: pp. 127-133.
- Lee, B. H. (1996). *Fundamentals of food biotechnology*. New York, U.S.A.: VCH.
- Lee Ivester, A. & J. Neefus (2001). *Industria de productos textiles. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Vol. III*. Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. J. Stellman.
- Ma, S. K., J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman & R. A. Sheldon (2010). *A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate*. Green Chemistry 12(1): pp. 81-86.
- Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan & R. Fernandez-Lafuente (2007). *Improvement of enzyme activity, stability & selectivity via immobilization techniques*. Enzyme & microbial technology 40(6): pp. 1451-1463.
- Mordor-Intelligence (2015). *Global Food Enzymes Market (2015-2020)*. Sample report. Bengaluru, India.: pp. 32.
- Nelson, D. L., A. L. Lehninger & M. M. Cox (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Portland U.S.A.: Macmillan.

- Novozymes (2005). *Textile laundry DeniBleach*. Application sheet.
- Pandey, A. (2006). *Enzyme technology*. Springer Science & Business Media.
- Petersen, G. R. & W. Scouten (1999). *The present state of biocatalysts. Essential Tools For A Sustainable 21st Century Chemical Industry*. NewBiocatalysts 1: pp. 1-38.
- Plou, Francisco (2016). *Las enzimas*. CSIC. Editorial los libros de la Caratata. Madrid, España.
- Polaina, J. & A. P. MacCabe (2007). *Industrial enzymes. Structure, Function & Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Powell, K. A., S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp & G. W. Huisman (2001). *Directed evolution & biocatalysis*. *Angewandte Chemie International Edition* 40(21): pp. 3948-3959.
- Rajan, M. (2004). *Enzymes for Industrial Applications*. RC-147U. Norwalk, CT.
- Rodríguez-Couto, S. (2012). *Laccases for denim bleaching: an eco-friendly alternative*. *Sigma 1*: pp. 10-12.
- Rozzell, J. D. (1999). *Commercial scale biocatalysis: myths & realities*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7(10): pp. 2253-2261.
- Schloss, P. D. & J. Handelsman (2003). *Biotechnological prospects from metagenomics*. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): pp. 303-310.
- Schmid, A., J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts & B. Witholt (2001). *Industrial biocatalysis today & tomorrow*. *Nature* 409(6817): pp. 258-268.
- Sheldon, R. A. (2007). *Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable & recyclable biocatalysts*. *Biochemical Society Transactions* 35(6): pp. 1583-1587.
- Straathof, A. J., S. Panke & A. Schmid (2002). *The production of fine chemicals by biotransformations*. *Current opinion in biotechnology* 13(6): pp. 548-556.
- Straathof, A. J. J. & P. Adlercreutz (1999). *Applied biocatalysis*. Amsterdam, Harwood Academic.
- Torres, E. & G. Sandoval (2015). *Informe técnico Red BIOCATTEM (proy. 245413)*. Anexo 3.2. CONACYT.

- Tramper, J. & P. B. Poulsen (2000). *Enzymes as processing aids & final products. Applied biocatalysis*. A. J. Straathof & P. Adlercreutz. London, CRC Press.
- van Rantwijk, F. & R. A. Sheldon (2007). *Biocatalysis in ionic liquids*. *Chemical reviews* 107(6): pp. 2757-2785.
- Veit, T. (2004). *Biocatalysis for the production of cosmetic ingredients*. *Engineering in life Sciences* 4(6): pp. 508-511.
- Voet, D., J. G. Voet & C. W. Pratt (1999). *Fundamentals of biochemistry*. New York, USA: Wiley.
- Wohlgemuth, R. (2010). *Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry*. *Current opinion in biotechnology* 21(6): pp. 713-724.
- Woodyer, R. D., T. W. Johannes & H. Zhao (2006). *Regeneration of cofactors for enzyme biocatalysis*. *Enzyme technology*: pp. 83-101.
- Zaks, A. (2001). *Industrial biocatalysis*. *Current Opinion in Chemical Biology* 5(2): pp. 130-136.
- Zaks, A. & A. M. Klivanov (1985). *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(10): pp. 3192-3196.
- Zhao, H., K. Chockalingam & Z. Chen (2002). *Directed evolution of enzymes & pathways for industrial biocatalysis*. *Current Opinion in Biotechnology* 13(2): pp. 104-110.

Capítulo 6

Ingeniería biomédica y sus aplicaciones

*Nohra Elsy Beltrán Vargas **

Introducción

La ingeniería biomédica surge como una aplicación de principios de ingeniería en la resolución de problemas en medicina, biología, biotecnología, farmacia, entre otros. Es una de las disciplinas estrechamente relacionada con la ingeniería biológica, ya que busca el diseño y producción de nuevas tecnologías para diagnóstico, tratamiento y el estudio de las ciencias biológicas y las enfermedades humanas. La combinación de la ingeniería biológica y biomédica, han generado avances que ayudan a las personas para tener vidas más largas, sanas y productivas. Se basa en el entendimiento de la fisiología y se apoya en herramientas de análisis provenientes de las matemáticas, la física, la química y las ciencias computacionales.

Las aplicaciones tradicionales de la ingeniería biomédica incluyen:

La bioinstrumentación, se usa, para el diseño y construcción de equipos electrónicos utilizados en hospitales por personal médico o paramédico; el procesamiento de imágenes de equipos de diagnóstico como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la tomografía axial computarizada (TAC), el ultrasonido, los rayos X, entre otros.

La biomecánica se dedica a diseñar y construir prótesis óseas, válvulas para el sistema cardiovascular, miembros ortopédicos, equipos de ayuda a la movilidad, etc.

Los biomateriales son empleados para reproducir la función de los tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura como, por ejemplo: en los trasplantes de órganos, sustitución de válvulas cardíacas, implantación de miembros a amputados, suturas, material quirúrgico, catéteres, biosensores, entre otros.

En los últimos años han surgido otras aplicaciones de la ingeniería biomédica mayormente enfocadas al área de la biotecnología, que es más cercana a la química, la bioquímica, la biología o la farmacia. Algunos de sus usos en el área biomédica son: la regeneración tisular, la terapia celular, la ingeniería de tejidos y órganos, desarrollo de nuevos fármacos

* Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. nbeltran@correo.cua.uam.mx

y terapias. El diseño de biomateriales para diferentes aplicaciones como el tratamiento de quemados con piel biotecnológica; biomateriales inteligentes, vejigas artificiales, sangre sintética, etc. Se puede encontrar información sobre estas aplicaciones biotecnológicas en el libro de Yarmush y *et al.*, (Yarmush, Toner et al, 2003).

Algunos de los problemas en los que puede ayudar un ingeniero en el área médica incluyen:

- El análisis de los datos del genoma humano, se usa para la identificación de posibles nuevos fármacos.
- El diseño de programas que permitan analizar la estructura tridimensional de proteínas; el diseño de una bomba de insulina; el modelado de órganos fisiológicos (modelos de corazón, del sistema vascular, nervioso, respiratorio, renal, etc.).
- El análisis de datos de pacientes en una unidad de cuidados intensivos; el estudio de imágenes de rayos X (TAC), resonancia magnética nuclear, tomografía de emisión de positrones (PET)
- El diseño de software y algoritmos para aplicaciones bioinformáticas, de gestión hospitalaria, telemedicina y asistencia domiciliaria
- El diseño de tejidos artificiales, cultivos celulares para su uso en terapia celular, y la generación de órganos artificiales.

Fisiología humana

Para orientar al estudiante de ingeniería biológica hacia las aplicaciones médicas, se debe partir del entendimiento de la fisiología humana, y así tener la capacidad y el conocimiento para construir dispositivos y sistemas para mejorar o reparar el cuerpo humano.

La fisiología estudia las funciones de un ser vivo, en particular en el caso del cuerpo humano, examinando cómo trabajan las diferentes partes de este, se analiza cómo realizan sus actividades para mantener la vida. Su objetivo, es el de explicar los factores físicos y químicos responsables del origen, desarrollo y progresión de la vida.

Desde las bacterias más sencillas hasta el ser humano, todos los seres vivos tienen sus propias características funcionales. Pero hay que considerar, que el cuerpo humano está formado por más de 100×10^{12} células, de diferentes tipos y funciones.

La fisiología se enfoca en eventos a nivel celular y molecular, debido a que las habilidades del cuerpo humano dependen de células individuales, las cuales a su vez dependen de reacciones químicas que se realizan dentro de estas.

El cuerpo humano está formado por sistemas interconectados entre sí, que a su vez están integrados por varios órganos, los cuales tienen en su interior diferentes tipos de tejidos y de células. Estos sistemas son:

Sistema cardiovascular: es el que transporta la sangre desde el corazón a los diferentes órganos del cuerpo a través de los vasos sanguíneos. Está formado por el corazón, los vasos sanguíneos (venas, arterias y capilares) y la sangre.

Sistema digestivo: es el que se encarga del transporte de los alimentos, de la secreción de jugos digestivos, la absorción de los nutrientes a través de la digestión y la excreción. Está formado por varios órganos formando un gran tubo desde la boca hasta el ano. Sus órganos incluyen: la cavidad oral, esófago, estómago, intestinos, hígado y páncreas.

Sistema endocrino (o sistema hormonal): es el que produce hormonas que son liberadas a la sangre regulando algunas de las funciones del cuerpo incluyendo el estado de ánimo, el crecimiento y el metabolismo. Está formado por varias glándulas como: pituitaria, timo, tiroides, paratiroides, adrenal, pineal; los ovarios o testículos, y el páncreas.

Sistema inmunológico (o sistema inmunitario): es el que permite la protección contra enfermedades, identificando células patógenas para eliminarlas, y cancerosas.

Sistema linfático: es el encargado de formar y activar el sistema inmune. Está formado por conductos cilíndricos parecidos a los vasos sanguíneos que transportan un líquido transparente llamado linfa, y recolectan el quilo (un fluido producto de la digestión de las grasas de los alimentos ingeridos). Está formado por: los vasos linfáticos, los ganglios, el bazo, el timo, la linfa y los tejidos linfáticos (como la amígdala y la médula ósea).

Sistema muscular: es el de protección de los órganos internos del cuerpo, responsable del movimiento, además protege el sistema óseo. Está formado por: músculos lisos o estriados que se unen a los huesos, y el músculo cardíaco.

Sistema nervioso: es el de control del cuerpo humano, formado por conexiones nerviosas que permite transmitir y obtener información del medio que nos rodea; y a partir de esta, enviar señales para que se lleven a cabo las diferentes funciones de los órganos del cuerpo. Está integrado por: el cerebro, la médula espinal, los nervios y los receptores sensoriales.

Sistema óseo: es el sistema de apoyo estructural y protección a los órganos internos, mediante huesos. Está formado por: huesos, cartílago, tendones, ligamentos y articulaciones.

Sistema reproductor: es el que está relacionado con la fecundación sexual, encargado de preservar la vida. Está integrado por: los órganos sexuales.

Sistema respiratorio: es el encargado de suministrar el oxígeno a todas las células del cuerpo y eliminar el dióxido de carbono procedente del anabolismo celular. Contribuye a mantener el equilibrio ácido-base en la sangre. Está formado por: las fosas nasales, faringe, laringe, tráquea, bronquios, y pulmones.

Sistema urinario (o sistema excretor): Es el que expulsa los desechos generados en el proceso digestivo. Está formado por: los riñones, uréteres, vejiga y uretra.

Sistema tegumentario: es el encargado de la protección de todos los demás sistemas del cuerpo humano de daños mecánicos, químicos, y de bacterias del medio exterior. Excreta sales y urea, ayuda en la regulación de la temperatura corporal. Está formado por la dermis y epidermis.

Con el objeto de lograr un mayor entendimiento de la fisiología y de los sistemas del cuerpo humano; existe software comercial interactivo de fisiología como: el Interactive Physiology®, A.D.A.M. Education®, PhysioEX®. En los que se permite al estudiante entender cómo funciona el cuerpo humano a través de animaciones, videos y juegos; además de generar preguntas de autoevaluación y reafirmación de conceptos. Las animaciones se enfocan en los procesos celulares y moleculares que ocurren en los diferentes sistemas, sus relaciones, así como cambios en el tiempo. Una vez que el estudiante comprenda el funcionamiento del cuerpo humano, será posible estudiar algunas de las aplicaciones de la ingeniería biomédica.

También existen simuladores del cuerpo humano, como el sistema Biopac®, en donde se simulan los signos vitales; y se pueden realizar mediciones fisiológicas a través del uso de diferentes biosensores.

Este tipo de laboratorios virtuales, modifica la forma en que los estudiantes aprenden fisiología, eliminando las complejas tareas de preparación para el trabajo con seres vivos, permitiendo así concentrarse en el aprendizaje.

A pesar de que existen numerosos libros para entender los principios básicos de la fisiología humana, se recomienda el libro de Marieb y Hoehn (Marieb & Hoehn 2007); ya que presenta los conceptos de una manera muy clara y fácil de entender, para estudiantes de diferentes disciplinas que necesitan de la fisiología humana.

Hay otros libros que resumen la fisiología con un enfoque para ingenieros; como el libro de Saltzman (Saltzman 2009), o el de los Kroemer (Kroemer, Kroemer et al, 2010), que pueden ser de utilidad para quienes se interesen en estudiar la fisiología humana desde el punto de vista de la ingeniería, y desarrollar nuevos dispositivos o aplicaciones de la ingeniería en el área médica.

A continuación, veremos algunas aplicaciones de la ingeniería biomédica con ejemplos en diferentes sistemas del cuerpo humano.

Aplicaciones de la ingeniería biomédica

Modelado fisiológico

Modelar la fisiología humana es un problema complejo, ya que como se mencionó anteriormente el cuerpo humano está formado por 12 sistemas, los cuales están interconectados para mantener la homeostasis (equilibrio dentro del cuerpo), aun cuando el medio exterior esté cambiando continuamente. Todo está regulado por el sistema endocrino y controlado por el sistema nervioso. Por lo cual hay que considerar modelos estocásticos, no lineales que varían en función del tiempo. Otra característica importante que hay que considerar al modelar alguno de los sistemas del cuerpo humano, es la retroalimentación; lo cual es algo inherente de las reacciones químicas que ocurren dentro del organismo. Normalmente la retroalimentación es negativa, pero existen algunos casos en donde es positiva.

Debido a la complejidad fisiológica del cuerpo humano, en muchas ocasiones no es posible medir directamente (*in vivo*) las variables de interés. Por lo anterior, se realizan mediciones indirectas, las cuales necesitan de modelos que permitan inferir el valor de la cantidad real de interés. Muchas de las mediciones de metabolitos, se obtienen a través de lecturas de análisis sanguíneos, cuando los procesos ocurren directamente en los tejidos; que serían realmente los valores de interés. Tampoco es posible medir las secreciones de las glándulas endocrinas, por ejemplo.

Algunas de las aplicaciones en las que se trabaja actualmente con ayuda de diferentes sistemas computacionales incluyen:

Modelado de fuerzas que actúan en diferentes partes del cuerpo, para generación de prótesis.

- Modelado de vasos sanguíneos, para la generación de biomateriales cardíacos como los “stents”, (ver figura 6.1).
- Modelado de flujos de aire en los pulmones, para evaluar modelos respiratorios en pacientes con diferentes enfermedades.
- Modelado de reacciones químicas que ocurren dentro de las células, para aplicaciones en bioinformática (genoma humano).
- Modelado del proceso fisiológico de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes (angiogénesis), para el tratamiento de cáncer.
- Modelado de la función renal, para predecir el momento en el cual un paciente necesitará de hemodiálisis.
- Modelado de la glucosa y la insulina, en los pacientes diabéticos.
- Modelado de válvulas cardíacas como las que se muestran en la figura 6.2, para evitar turbulencia o daño de la sangre (hemólisis) cuando pasa a través de la válvula.

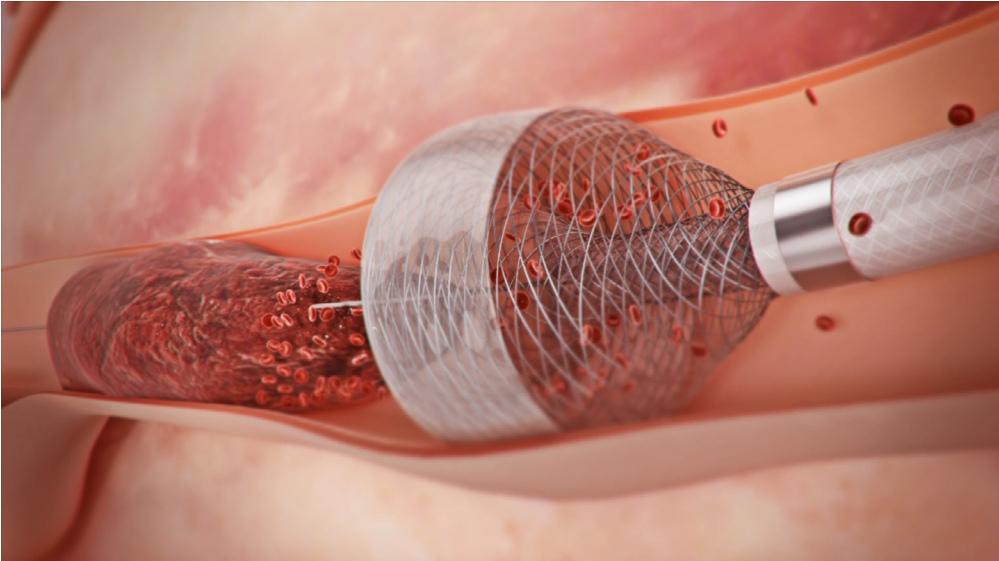


Figura 6.1. Modelado de “stent”, endoprótesis vascular que ayuda a abrir un vaso sanguíneo que suministra sangre al corazón. Es un pequeño tubo de malla metálica que se expande dentro de una arteria.

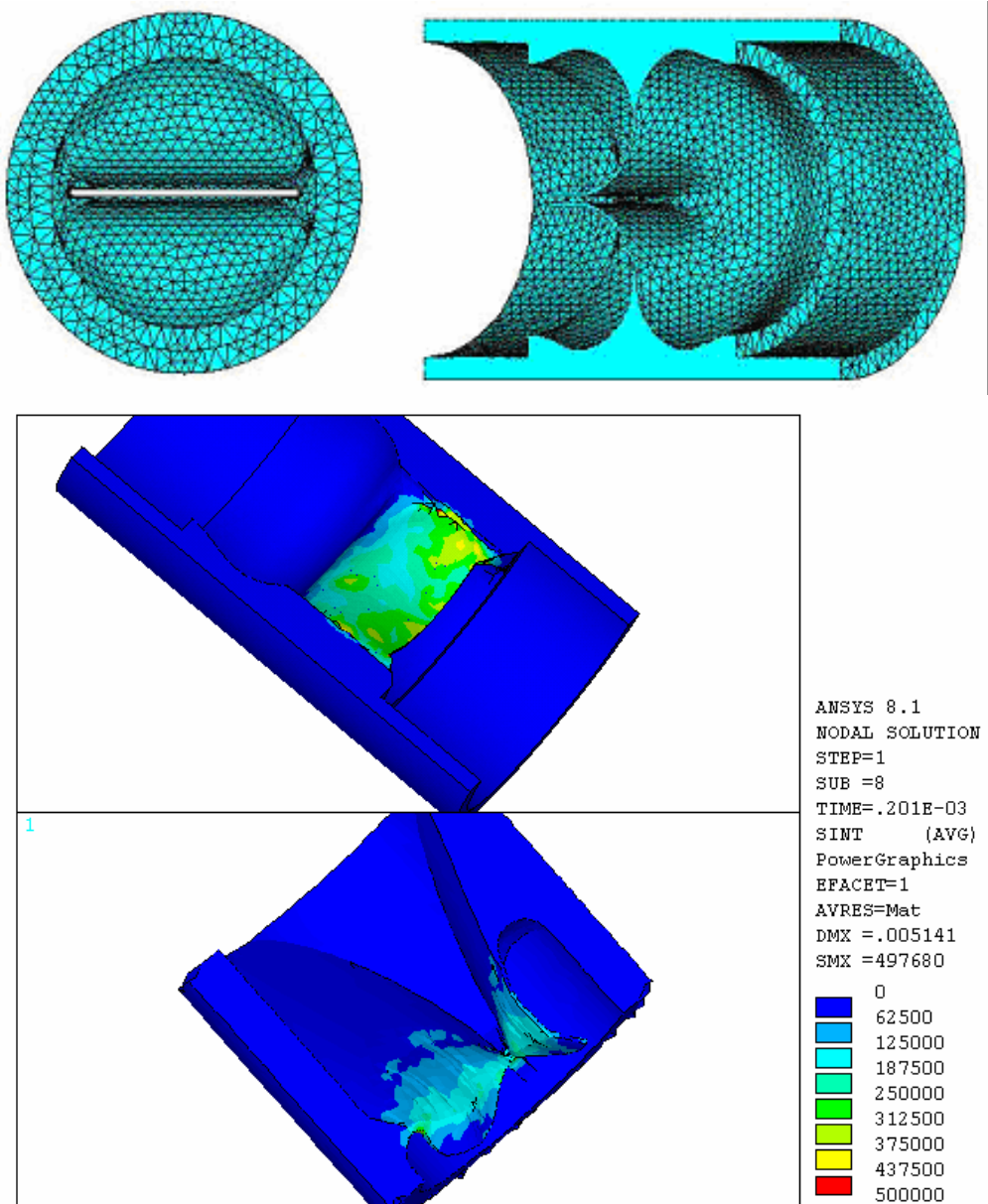


Figura 6.2. Modelado de válvulas cardiacas mediante elemento finito. En la parte superior se observa el modelado de una válvula en un corte longitudinal y uno transversal. En la parte inferior se observa el modelado de la resistencia del material cuando se está fabricando la válvula.

Además de modelar el material, la geometría y cómo se inyectaría el material en el molde, es posible realizar el cálculo de flujo que pasaría a través de una válvula cardíaca diseñada con dos o con tres valvas, como se observa en la figura 6.3.

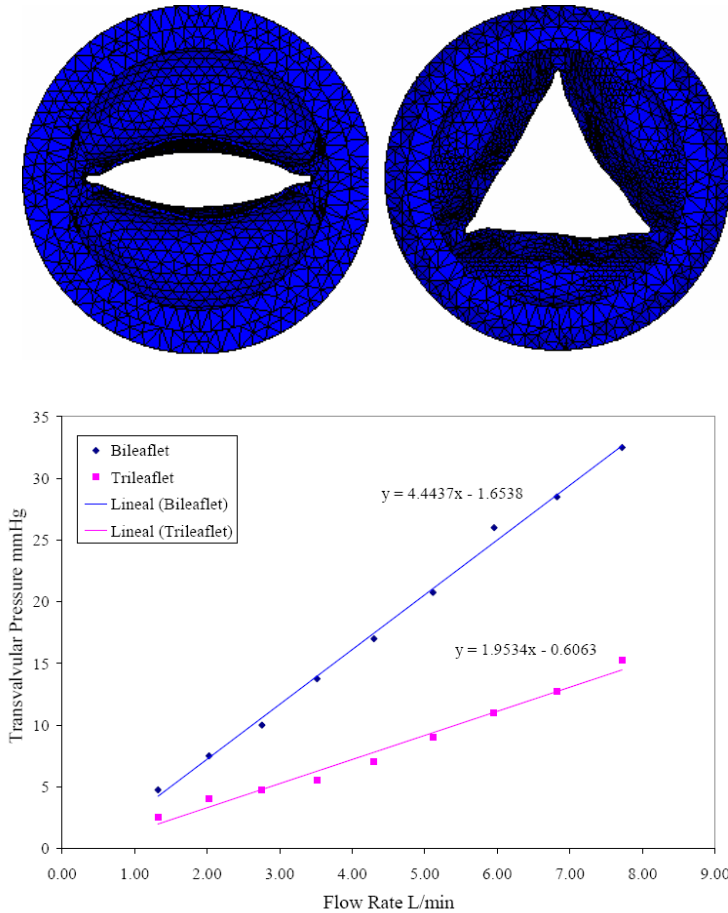


Figura 6.3. En la figura superior se observa la simulación de la apertura de una válvula cardíaca con dos valvas (izquierda), o con tres valvas (derecha). En la figura inferior se observa el cálculo del flujo sanguíneo que pasará a través de las válvulas cardíacas modeladas en la parte superior. Es una variable que no se puede medir directamente en un ser vivo, por lo cual se hacen aproximaciones mediante mediciones indirectas.

Biomecánica

Otra de las aplicaciones en la que se trabaja, es un área interdisciplinaria en donde se estudian: los fenómenos mecánicos y cinemáticos que tienen los seres vivos, los cuales son sistemas complejos formados por tejidos. Se analizan: movimientos, equilibrio, resistencia, física y mecanismos de lesión que pueden producirse por ciertos movimientos físicos. Al igual que en la aplicación anterior, se necesita conocer la anatomía y fisiología humanas para poder resolver los diferentes problemas. Mucho del trabajo que se realiza en esta área se basa en los modelos matemáticos que se hacen sobre el sistema óseo y sus lesiones físicas.

Algunas de las aplicaciones que se desarrollan actualmente incluyen:

- Estudio de fuerzas producidas por ejercicio, condiciones de trabajo u otras actividades, sobre la fisiología tisular y el desempeño humano.
- Estudio de cómo las enfermedades afectan el desempeño mecánico de los tejidos, como el corazón.
- Diseño de reemplazo mecánico de cadera, articulaciones, válvulas cardíacas y de órganos.
- Estudio de la mecánica del movimiento celular en la circulación, o de la motilidad en los tejidos.

Uno de las lesiones de rodilla que afecta a muchos deportistas, es el desgarre del ligamento cruzado, lo cual impide que la tibia se deslice hacia delante. En muchos casos requiere cirugía. Es por esto que es importante estudiar las fuerzas que intervienen en el movimiento, así como la posición y grado de tensión de los ligamentos, los cuales dan unión a los huesos manteniendo estables las articulaciones. En la figura 6.4, se observa cómo es la articulación de la rodilla.

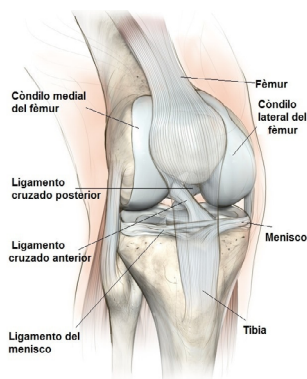


Figura 6.4. Articulación de la rodilla. En la anatomía de la rodilla normal se observa la unión de varios huesos: fémur, tibia y peroné, en el centro y cara anterior de la articulación de la rodilla se encuentra la rótula. La unión de los huesos se hace por medio de ligamentos.

A partir de las herramientas de análisis de la biomecánica, se pueden diseñar e implementar diferentes opciones para la rehabilitación de pacientes; con el fin de mejorar las actividades de la vida diaria de personas con discapacidades físicas, sensoriales, de comunicación, de movilidad, entre otras.

Se diseñan dispositivos para que estas personas puedan realizar actividades diarias como comer, peinarse, leer. También se trabaja en el diseño de estimuladores eléctricos funcionales, o electrocutáneos para comunicación sensorial, que sean libres de dolor para el paciente. En la figura 6.5, se observa el diseño de varias prótesis de pierna con el uso de varios biomateriales.

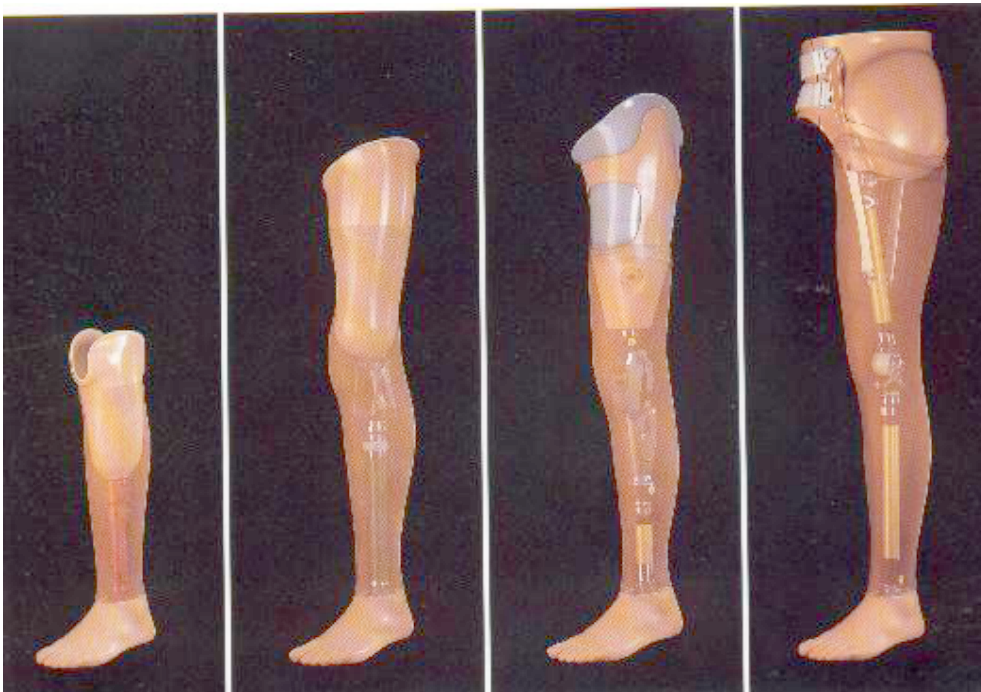


Figura 6.5. Prótesis de miembro inferior. El tamaño de la prótesis depende del grado de lesión y cómo se fijará al cuerpo.

Procesamiento de imágenes

Una de las áreas en la que más trabajan los ingenieros biomédicos en México y en varias partes del mundo, es el procesamiento de imágenes obtenidas mediante diversas técnicas de diagnóstico que van desde los rayos X, hasta la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Este método, permite mejorar los diagnósticos y brindan al clínico información más detallada sobre las diferentes partes del cuerpo sin necesidad de un procedimiento quirúrgico.

Se realiza la segmentación de las imágenes y se procesan para finalmente realizar una reconstrucción tridimensional.

Las imágenes médicas poseen gran cantidad de ruido y una gran variabilidad. Cada una de las técnicas empleadas para la obtención de imágenes del cuerpo humano se enfoca en un análisis específico, por lo cual sus características difieren entre cada una de ellas. En la figura 6.6, se observan algunos ejemplos.

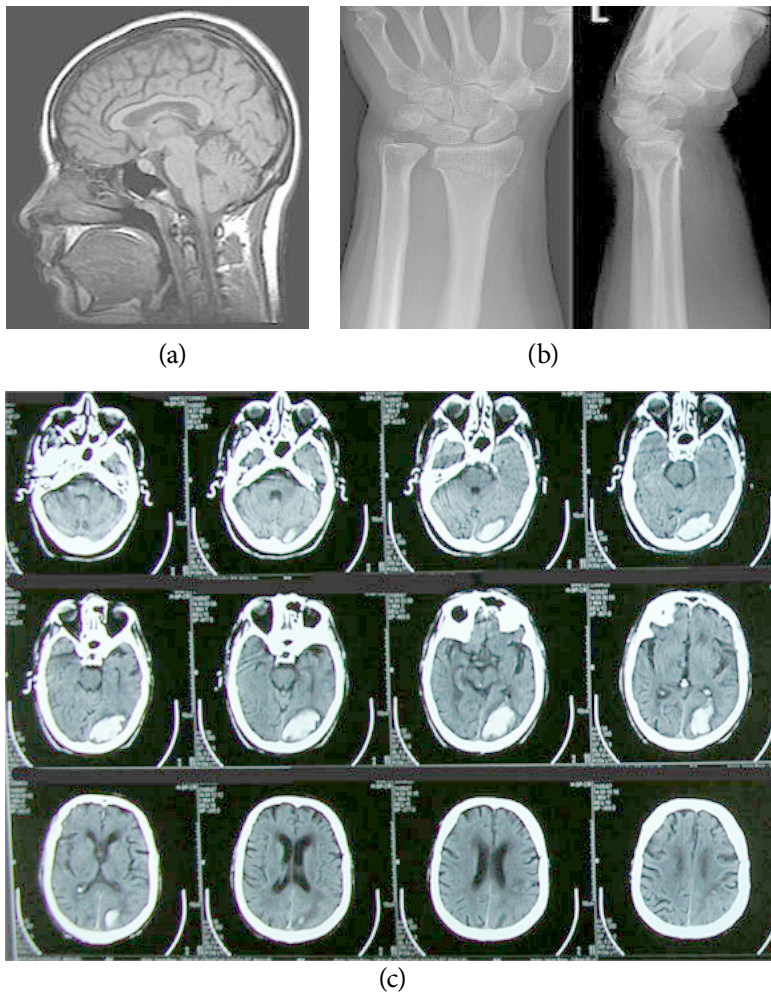


Figura 6.6. a) Imagen del cerebro obtenida mediante resonancia magnética nuclear. b) Imagen de parte de la mano y de la muñeca obtenida mediante rayos X. c) Imagen de diferentes cortes cerebrales obtenida mediante tomografía axial computarizada.

Bioinstrumentación

Esta área, que es junto con el procesamiento de imágenes, de las más trabajadas por los ingenieros biomédicos; tiene varias aplicaciones, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de los pacientes.

Con fines de diagnóstico, se diseñan y construyen equipos como: los monitores de signos vitales, los electrocardiógrafos, electroencefalógrafos, tomógrafo, ecógrafo, entre otros.

Con fines terapéuticos, los principales retos han estado enfocados en el diseño e implementación de órganos artificiales a partir del estudio y diseño de biomateriales. Se han desarrollado órganos artificiales como: corazón (figura 6.7), pulmón (figura 6.8), riñón (figura 6.9), páncreas e hígado. Los cuales pueden dar apoyo a pacientes en falla aguda, o ser puente a trasplante en casos de que el problema sea crónico.

El diseño de estos sistemas involucra el modelado de procesos relacionados con el diseño y funcionamiento de estos órganos de manera artificial.

- Hígado: métodos de destoxificación
- Páncreas: métodos no intrusivos, para manipular y controlar los niveles de glucosa en el paciente diabético
- Riñón: métodos para purificar la sangre

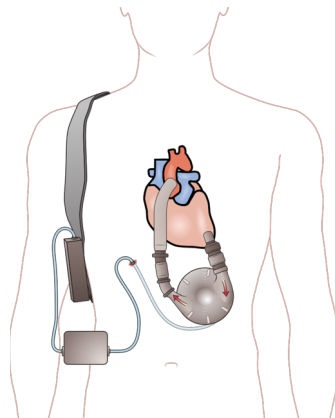


Figura 6.7. Sistema de asistencia ventricular, que funciona como un corazón artificial dando ayuda al bombeo de la sangre en un paciente con insuficiencia cardiaca crónica. Puede ser utilizado como puente al trasplante del órgano.



Figura 6.8. Sistema de circulación extracorpórea, utilizado durante una cirugía a corazón abierto. La parte derecha es un oxigenador, que sustituye la función de los pulmones, para oxigenar la sangre que va a los diferentes órganos y tejidos del cuerpo (autor de figura: SORIN Group).



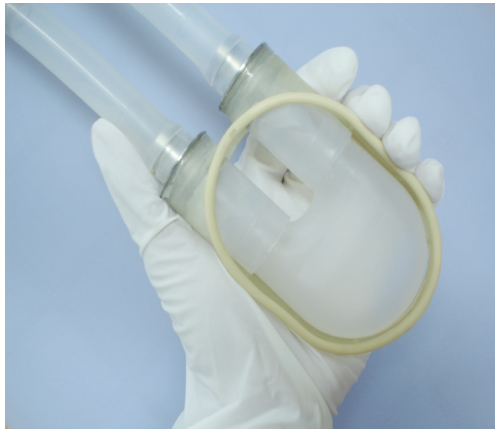
Figura 6.9. Sistema de hemodiálisis o riñón artificial, el cual se encarga de limpiar la sangre de toxinas, urea y creatinina, cuando el paciente se encuentra en insuficiencia renal aguda o crónica.

Biomateriales

Los biomateriales son: materiales que pueden estar en contacto con tejidos vivos e interactuar con células, a fin de ayudar a mejorar o reproducir el funcionamiento de un tejido u órgano, sin producir alteraciones fisiológicas en el organismo. Se implantan por un tiempo determinado, y debe generar pocas o nulas reacciones biológicas durante el tiempo que se encuentre dentro del cuerpo humano o del ser vivo.

Para introducir un material dentro de un ser vivo hay que considerar que sea químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos durante el tiempo que se encuentre implantado.

Al diseñar los dispositivos que se van a implantar, es necesario estudiar a fondo las propiedades fisicoquímicas de los materiales, así como su interacción con las células y tejidos, a fin de que puedan cumplir satisfactoriamente su función dentro del organismo. También hay que evaluar su proceso de maquilado, y los costos asociados a los procesos involucrados, para que sea un material biocompatible y de fácil producción a escala. A continuación, se muestran piezas diseñadas en silicón grado médico, utilizadas en un sistema de asistencia ventricular. Lo que se implante dentro del organismo debe ser: ergonómico, fácilmente esterilizable y funcional (ver figura 6.10).



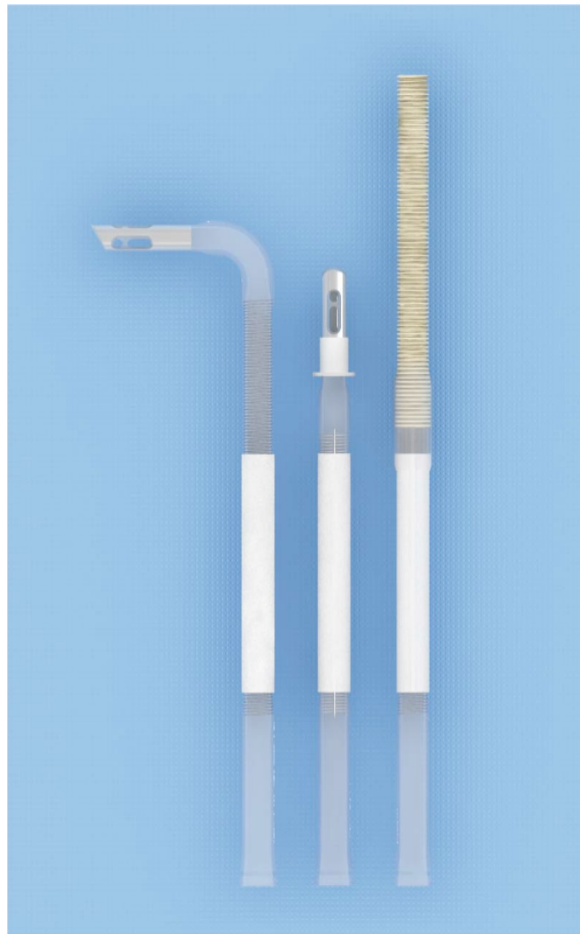
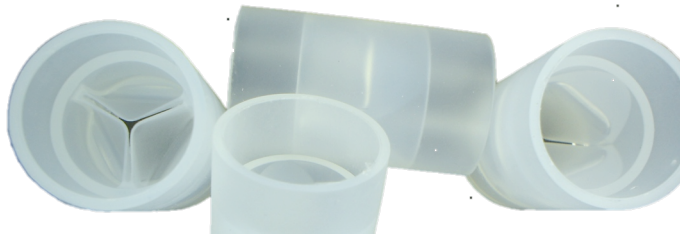


Figura 6.10. Diseño de varios dispositivos a utilizarse dentro del cuerpo humano usando silicón grado médico. En la parte superior se observa un saco que simula el corazón, con entradas y salidas a través de válvulas; como las que se muestran en la parte inferior. Todo el sistema debe ser conectado al paciente a través de cánulas (o tubos por donde pasa la sangre), las cuales deben ser flexibles y evitar el daño de la sangre, o del corazón cuando entren en contacto con el cuerpo humano.

Ingeniería biomolecular

Con el surgimiento de la tecnología de ADN recombinante, la de los anticuerpos monoclonales, además de las nuevas técnicas para el estudio, así como manipulación de las células y tejidos. En el campo de la biotecnología han surgido numerosas aplicaciones para la industria, la medicina y la ciencia en general.

En el caso de los ingenieros biomédicos, en muchos programas tanto de licenciatura como de posgrado se está trabajando en temas como:

El análisis fármaco-cinético, el cual predice modelos de absorción y metabolismo de medicamentos (mediante modelos matemáticos). El diseño de técnicas de suministro de medicamentos. Diversas aplicaciones en el sistema inmune para la generación de vacunas. Generación de diversos tratamientos para el cáncer. El desarrollo de nuevas aproximaciones y técnicas para manipulación de material genético, con la elaboración de nuevas proteínas con ciertas propiedades bioquímicas mejoradas. La producción de anticuerpos monoclonales; entre otros. Estas aplicaciones y otras pueden ser consultadas en diversos tratados de bioingeniería, o en el libro de Yarmush y *et al*, (Yarmush, Toner et al, 2003) que está enfocado en las aplicaciones biomédicas.

A continuación, se describe brevemente las aplicaciones biotecnológicas diseñadas para la medicina regenerativa, que es un nuevo enfoque terapéutico basado en células del mismo paciente para buscar su reparación o auto-regeneración.

Aplicaciones biotecnológicas en medicina

Buscan tratar enfermedades y accidentes que involucren el crecimiento de células y tejidos; la realización de compuestos en laboratorio, así como el desarrollo de órganos artificiales.

Terapia celular

Esta terapia está enfocada en el uso de células troncales o células madre, las cuales tienen una alta capacidad de proliferación y se pueden diferenciar en cualquier tipo celular.

El objetivo de esta terapia es: poder sustituir las células no viables por otras sanas y con ello poder recuperar funciones perdidas en diferentes partes del cuerpo.

Las células troncales son aquellas que por acción de las telomerasas se encuentran indiferenciadas, y por eso tienen una gran capacidad de proliferación. También al someterlas a los estímulos pertinentes pueden dar lugar a diversos tipos de células especializadas. La fuente principal de las células troncales son los embriones y los anejos de estos (placenta y cordón umbilical), pero también los adultos tienen algunas en los tejidos.

La siguiente es una clasificación basada en el grado de diferenciación celular:

Las células totipotenciales son las que provienen de las primeras divisiones o del mismo cigoto, ya que pueden formar al individuo completo.

Las células pluripotenciales son las que pueden dar origen a muchos tejidos, pero ya no a un embrión completo; estas se obtienen después de la formación de la blástula o en los anejos embrionarios.

Finalmente, están las células multipotenciales, que se encuentran en los tejidos adultos y pueden dar origen a múltiples linajes celulares, pero únicamente los que son dañados y se encuentran en las cercanías de su ubicación, pero son tan escasas que su obtención es muy difícil.

Todas estas son células naturales, que tienen sus propiedades sin manipulación. Las que presentan una manipulación para estar indiferenciadas o desdiferenciadas son llamadas Células Madres Pluripotentes Inducidas, (iPS o iPSC, por sus siglas en inglés). Para obtenerlas se modifica la actividad de diversos genes provocando alteraciones en el ADN lo que puede llevar al desarrollo de tumores. Estas técnicas utilizan retrovirus para transformar las células en pluripotentes, pero puede generar inestabilidad genética.

Al realizar este tipo de terapia, hay que considerar que las células troncales embrionarias pueden generar tejidos anárquicos no deseados, y formación de teratomas.

Ingeniería de tejidos

Es la aplicación de métodos y herramientas de la ingeniería, así como de las ciencias biológicas para entender la estructura y función de los tejidos; desarrollando sustitutos biológicos que restauren, reparen, mantengan y/o mejoren la función de éstos.

Esta disciplina, está formada por una triada que consta de: i) la fuente celular, ii) el soporte o andamio en el cual crecerán las células y, iii) las señales biológicas o físicas que permitirán que las células proliferen en mejores condiciones para poder formar el tejido de interés (figura 6.11).

Las células pueden estar diferenciadas o ser preferiblemente troncales, como se mencionó previamente por su alta capacidad de proliferación y diferenciación.

En la construcción de andamios se utilizan biomateriales que puedan ser compatibles con la matriz celular, ya que la estructura es muy importante para desarrollar una función específica de la célula. Estos materiales son polímeros que ayudan a dar soporte al injerto además favorecen la restauración y la funcionalidad parcial o total de los tejidos dañados.

Las características principales de los biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos son:

- Porosidad adecuada, para favorecer la integración del tejido y la vascularización.
- Biodegradabilidad y compatibilidad histoquímica.
- Resistencia a infecciones y a microorganismos.
- Resistencia a hipoxia.
- Fácil preparación, manejo y almacenaje.
- Durabilidad y estabilidad a largo plazo.

Respecto a las señales que debe recibir el constructo (células en andamios) pueden ser químicas (factores de crecimiento), o físicas (estimulación mecánica o eléctrica).

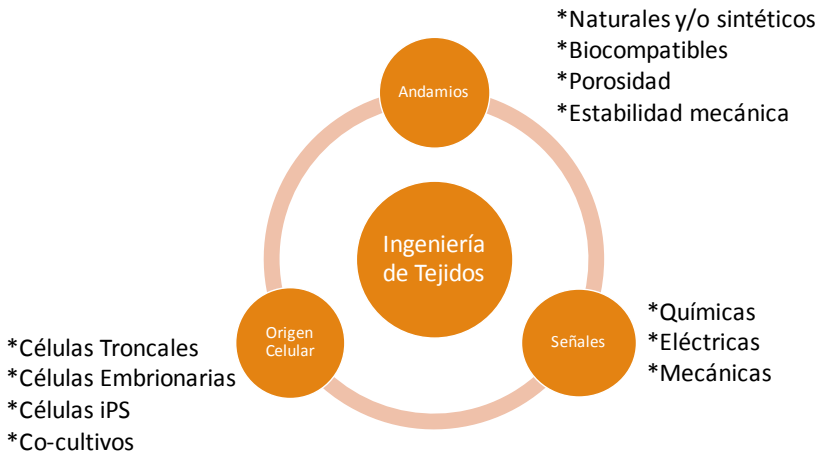


Figura 6.11. Triada de elementos involucrados en la ingeniería de tejidos.

El crecimiento de los tejidos puede realizarse en ambientes controlados como los biorreactores, en donde por lo general se utilizan diseños basados en perfusión para lograr mayor crecimiento celular. Se controla el pH, el consumo de oxígeno, entre otros parámetros: para evitar que las células se estresen y pierdan la capacidad de proliferación.

Actualmente, la ingeniería de tejidos juega un papel relativamente pequeño en el tratamiento de pacientes. Aunque ya se han realizado implantes de vejigas, pequeñas arterias, uretras, injertos de piel, cartílagos, tendones, ligamentos, huesos y tráqueas completas en pacientes, los procedimientos todavía no están estandarizados y son muy costosos. Mientras, tejidos de órganos más complejos como el corazón, pulmón e hígado se han recreado con éxito en el laboratorio, todavía falta mucho para reproducir otros completamente idénticos a los originales y que estén listos para ser implantados en un paciente. El mayor reto en esta área es

la generación de órganos completos a partir de células del paciente (autólogas), para lo cual es necesario generar un microambiente similar al natural donde se desarrollen los órganos de manera adecuada.

Sin embargo, estos tejidos pueden ser de gran utilidad en la investigación, especialmente en el desarrollo de fármacos. Mediante el uso de tejido humano funcional se pueden seleccionar medicamentos, acelerar su desarrollo para proveer de herramientas clave para facilitar la medicina personalizada, reduciendo costos y el número de animales que muchas veces se utiliza para experimentación.

Una de las industrias más desarrolladas es la relacionada con la generación de piel artificial (figura 6.12). Existen por lo menos siete empresas dedicadas a fabricar sustitutos epidérmicos, trece productos de sustitutos dérmicos y alrededor de seis productos dermo-epidérmicos.



Figura 6.12. Generación de piel artificial para el tratamiento de personas con quemaduras.

Algunos libros que pueden ser consultados sobre este tema se encuentran al final del capítulo.

Medicina regenerativa

Es una de las áreas más amplias de la medicina de los últimos tiempos, que involucra la ingeniería de tejidos y la genética; pero que además busca la auto-reparación a partir de los mismos sistemas del cuerpo, o con ayuda de biomateriales introducidos en el lugar de la lesión. Dentro de los objetivos de este tipo de medicina del futuro se encuentra: la curación de enfermedades sin tratamiento, la regeneración de tejidos dañados por vejez

o por un trauma, generar órganos para trasplante y solucionar problemas de trastornos genéticos o de enfermedades neurodegenerativas.

Para estudiar estos mecanismos de autoreparación, se estudian algunos anfibios como la salamandra y el ajolote, especie endémica de México, ya que tienen la capacidad de regenerar sus extremidades las veces que sea necesario además estas son completamente funcionales. Un tratamiento similar podría ser utilizado para pacientes amputados o con traumatismos severos.

Estos temas ya se estudian en diferentes partes del mundo a fin de prolongar y mejorar la calidad de vida.

Conclusiones

Como se mostró a lo largo de este capítulo, existe una gran variedad de aplicaciones de la ingeniería biológica hacia el área médica, para lo cual se necesitan de conocimientos en física, química, matemáticas y fisiología humana.

Todas estas aplicaciones de la ingeniería biomédica buscan un mayor entendimiento de los fenómenos y sistemas biológicos; con el desarrollo de nuevas técnicas y dispositivos para resolver problemas médicos, con el objeto de mejorar y extender la vida humana.

Hay muchos retos por resolver en las diferentes áreas de aplicación; sin embargo, se han obtenido grandes avances para facilitar al clínico el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías.

Problema 6.1 Diseño de un experimento para medir la permeabilidad de un andamio para su aplicación en cultivos celulares

*Nohra Elsy Beltrán Vargas
Angélica Reyes Lastiri
Alvaro Raúl Lara*

Introducción

Un experimento es una prueba que consiste en cambiar condiciones determinadas de operación de un sistema o proceso; con el fin de medir y analizar sus efectos; o de verificar una hipótesis o un principio científico. Normalmente se realizan para aumentar el conocimiento que se tiene de un sistema, o para mejorar el desempeño de un proceso.

El diseño de experimentos, es una forma de realizar pruebas con el fin de resolver un problema o comprobar una idea. Puede ser aplicado tanto en investigación como en la industria mediante la aplicación del método científico. Involucra una metodología que permite seguir ciertos pasos; con el fin de que los resultados sean reproducibles economizando en lo posible tiempo y dinero en la realización de los mismos.

En ingeniería biológica, es muy importante diseñar adecuadamente un experimento, ya que si no se sigue una metodología apropiada para reducir los errores experimentales, se podría llegar a conclusiones o interpretaciones que no son correctas sobre algo en particular. Además, se cuenta con una variabilidad intrínseca de seres vivos que pueden ser sujetos de estudio, y de las personas que toman las mediciones o realizan los experimentos. El diseño experimental requiere de la estadística, como una herramienta básica para poder analizar e interpretar los datos obtenidos. Para iniciar este, es importante definir o identificar, el problema de estudio o interés; las variables a medir y la relación entre ellas; con esto se podrá planear y realizar adecuadamente el experimento.

En este ejemplo, aplicaremos las etapas del diseño de experimentos en un problema en particular de la ingeniería biológica enfocado al área médica. En el cual se busca, medir la permeabilidad de un biomaterial diseñado para cultivar células animales.

Para entender mejor el problema de estudio, se expondrá una breve introducción sobre qué es un andamio celular y para qué se utiliza. Después se aplicará la metodología del diseño experimental que consta de los siguientes pasos básicos: planteamiento del problema a investigar; realización del experimento, análisis de resultados, interpretación de éstos y conclusión del estudio.

Contexto del problema

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que surge a finales de 1980 (Radisic & Christman, 2013), que aplica los principios de ingeniería, biología y ciencias de materiales; para desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido (Nugent & Edelman 2003). El producto final ideal es la formación de uno que sea similar al biológico, que pueda ser implantado en un paciente para la recuperación de un órgano en particular. Para lograrlo, los componentes claves a emplear son las células, moléculas de señalización; además de los llamados “andamios” (Chan & Leong, 2008) los cuales son: biomateriales tridimensionales que actúan como un molde para la formación del tejido (O’Brien, 2011).

Como parte de un proyecto de investigación, se diseñaron andamios específicos para cultivar células animales combinando materiales biocompatibles; es decir, que no dañan las células y pueden integrarse al cuerpo humano sin generar un rechazo por parte del organismo.

Problema

Diseñar un experimento para medir la permeabilidad de dos lotes de andamios para determinar si pueden ser utilizados para cultivos celulares. Aquí iniciamos el diseño del experimento, entendiendo y delimitando el problema de estudio.

Como se ha mencionado previamente, un “andamio” es: un biomaterial 3D que actúa como un molde para la formación de tejido, permitiendo además que las células migren, se adhieran y produzcan el tejido (O’Brien, 2011). Debe ser capaz de funcionar como un soporte para éstas durante el cultivo *in vitro*, así como cumplir con los requisitos biológicos y mecánicos deseados tras su implantación *in vivo*. Ante esta perspectiva, la arquitectura del andamio es un factor crucial en el desarrollo exitoso de un “constructo” (andamio con células) (Truscello, Kerckhofs et al, 2012).

Un aspecto que destaca en la estructura del andamio es su permeabilidad, la cual afecta directamente la difusión de nutrientes y desechos a través del mismo (Sell, Barnes et al, 2008). Sin importar el biomaterial empleado, ésta depende del tamaño del poro, el cual

tiene un papel indispensable en la penetración celular y el crecimiento del tejido. Por ello, determinar la permeabilidad y porosidad del andamio es de gran importancia para la ingeniería de tejidos (Chiu, Hecht et al, 2012).

Definición de metodología para medir la permeabilidad

Primero, se investigaron los diferentes métodos reportados para medir la permeabilidad de un andamio. A partir de esto, se define cómo y con qué se harán las mediciones, para poder planear adecuadamente todo el experimento.

Existen diversas pruebas experimentales que permiten la determinación de la permeabilidad de un andamio, implementando diferentes métodos para su medición y análisis. De manera general, se clasifican como: 1) métodos directos que emplean la ley de Darcy midiendo el flujo volumétrico y la caída de presión a través del andamio, y 2) métodos indirectos basados en la porosidad y tamaño de poro este que se aplican en modelos computacionales (Pennella, Cerino et al, 2013).

Entre los métodos directos, se encuentra el que está basado en la gravedad; que a su vez se subdivide en: considerar una cabeza de presión constante, o una cabeza de presión descendiente. En esta última, la cabeza de presión cambia porque la tubería es usada tanto para proveer el flujo del fluido a través del andamio, como para medir la cabeza de presión (Pennella, Cerino et al, 2013).

De manera general, el método de la cabeza de presión descendiente requiere de: una tubería que provea de una cabeza de agua y al mismo tiempo permita medir el volumen de agua que pasa a través del andamio; una cámara que contenga este y un reservorio para la recolección del agua (Wang, Meng et al, 2014).

Las ecuaciones que se consideran en este modelo dependen de la obtención de la conductividad hidráulica K , la cual se calcula de la siguiente manera (Pennella, Cerino et al, 2013):

$$k = K \frac{\mu}{\rho \cdot g} \quad (6.1)$$

Donde:

k es la permeabilidad;

μ es la viscosidad dinámica del agua o el fluido a emplear en el experimento;

ρ es la densidad del agua o el fluido a emplear;

g es la gravedad;

La conductividad hidráulica, puede estimarse usando la siguiente expresión de la ley de

Darcy:

$$v = K \cdot i \quad (6.2)$$

Donde:

v es la velocidad del fluido;

i es el gradiente hidráulico, que a su vez puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$i = \frac{H}{L} \quad (6.3)$$

Donde:

H es la distancia entre dos superficies de agua;

L es el grosor del andamio;

Una manera alterna, de expresar la ley de Darcy que permite considerar el flujo a cualquier tiempo dado, es la siguiente:

$$Q = K \cdot i \cdot A = -a \frac{dH}{dt} \quad (6.4)$$

Donde:

Q es el flujo del agua o el fluido a emplear;

a es el área perpendicular al flujo en la tubería;

A es el área perpendicular al flujo del andamio;

La ecuación anterior se integra y se consideran las siguientes condiciones de frontera:

$$t = t_0 = 0; \quad H = H_1 \quad (6.5)$$

$$t = t_2 = 0; \quad H = H_2 \quad (6.6)$$

La ecuación resultante es:

$$K = \frac{a \cdot L}{A \cdot t_2} \ln \frac{H_1}{H_2} \quad (6.7)$$

En este experimento; se analiza la permeabilidad de los andamios, con el método directo basado en gravedad de cabeza descendiente, considerando las ecuaciones anteriormente descritas.

Objetivo del experimento

Diseñar un sistema que permita el estudio de permeabilidad de los andamios por el método de cabeza descendiente.

Comparar la permeabilidad calculada entre dos lotes de andamios diseñados para cultivos celulares.

Hipótesis

Hipótesis nula (H_0): la permeabilidad calculada de andamios de dos lotes es igual

Hipótesis alternativa (H_A): la permeabilidad calculada de andamios de dos lotes es diferente para cada lote.

Definición de variables y factores:

Variable respuesta: permeabilidad del andamio

Factores de estudio: tiempo de caída de la cabeza de agua.

Factor de bloqueo: lotes.

Factores de confusión: temperatura ambiente, porosidad del andamio, grosor del andamio, viscosidad del agua, densidad del agua.

Realización del experimento

Una vez que se definen el factor de estudio y la variable respuesta, se planea organizadamente el trabajo experimental considerando los principios básicos del diseño experimental que incluyen: aleatorizar (se utilizaron diez andamios tomados al azar de cada lote), repetir (correr más de una vez el experimento, en este caso fueron seis veces con cada andamio) y bloquear (tomar en forma adecuada todos los factores que pueden afectar la respuesta observada, que en este caso son los lotes de estudio).

Se definen los instrumentos de medición a utilizar, el número de repeticiones y la captura de variables.

La experiencia en el trabajo de laboratorio es muy importante, para conocer los diferentes equipos e instrumental con el que se cuenta, así como el correcto manejo de los mismos. En este caso en particular, se diseñó un sistema muy sencillo que permite el análisis de la permeabilidad (figura 6.13), el cual consta de los siguientes componentes:

- Una pipeta de plástico, con la punta del extremo cortada. Esta será el equivalente a la tubería por donde fluirá el agua a través del andamio.
- Un soporte semi-transparente para el andamio que se coloca en el extremo inferior de la pipeta. El diámetro de este tiene que ser igual al interno de la pipeta, de esta manera el soporte no interrumpe el flujo del agua a través del andamio.
- Un vaso de precipitado como reservorio del agua que cae a través del andamio.
- Una piseta con agua destilada.
- Un soporte universal para sujetar la pipeta de manera vertical.
- Cronómetro Thermo Fisher para tomar el tiempo en que el agua descende hasta una marca determinada.
- Termómetro de mercurio para medir la temperatura del agua destilada utilizada en el experimento.

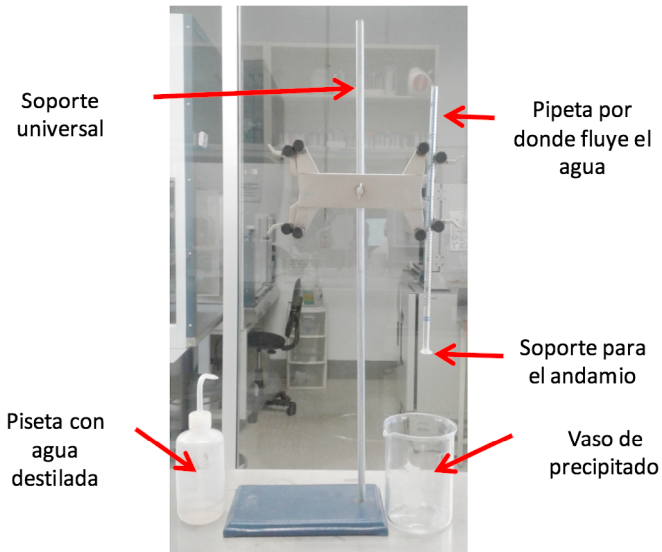


Figura 6.13. Sistema diseñado para las pruebas de permeabilidad.

Una vez preparado el sistema descrito, se procede con los siguientes pasos:

- i. Preparar los andamios y colocarlos en el soporte.
- ii. Llenar la pipeta utilizando la piseta con agua destilada (a la cual se le midió su temperatura).
- iii. Cuando el agua comienza a atravesar el andamio y descende se empieza a cronometrar el tiempo de bajada. La distancia desde la base del soporte universal hasta esta marca corresponde al valor de H_1 . Ver figura 6.14.
- iv. Cuando el agua llega a una marca predeterminada, se detiene el cronómetro registrando el tiempo medido (t_2). La distancia desde la base del soporte universal

hasta esta marca, corresponde al valor de H_2 .(Ver figura 6.14.) Una vez establecidos los valores de H_1 y H_2 , éstos deben mantenerse constantes para todos los andamios de ambos lotes.

- v. Se permite que toda el agua fluya por la pipeta. Se repite un total de seis veces los pasos del 3 al 5, de manera tal que al término del experimento se cuente con seis registros de tiempo t_2 por andamio.

Se sustituyen los valores obtenidos con los respectivos cálculos de: a , A y L ; en la ecuación de la conductividad hidráulica K . Este valor se emplea en la ecuación de la permeabilidad, sustituyendo además los valores conocidos para el agua de μ , ρ , g .

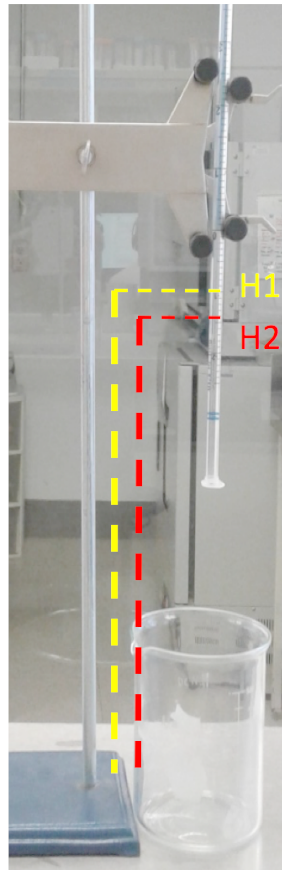


Figura 6.14. Determinación de las distancias H_1 (línea amarilla) y H_2 (línea roja). El cero corresponde a la base del soporte universal. Por lo tanto H_1 es la distancia desde la base hasta la marca 1 en la pipeta, H_2 es la distancia desde la base hasta la marca 2 de la pipeta.

Previo a las pruebas, se emplea un Vernier para determinar las dimensiones de los andamios y del área transversal al flujo del agua, los cuales se muestran a continuación:

$$\text{Área transversal de la pipeta} = a = \pi * D_i^2 = \pi * (6\text{mm})^2 = 37.27\text{mm}^2 \quad (6.8)$$

Donde:

D_i es el diámetro interno de la pipeta;

El área transversal al flujo del agua del andamio debe ser el mismo que el área transversal de la tubería, pues los andamios se cortan con un diámetro de 6 mm², por lo que área es 37.27 mm².

Se mide el grosor de todos los andamios (L), el cual fue constante para ambos lotes, con un valor de L igual a 2 mm. Se determina la altura H_1 , con un valor de H_1 igual a 29.4 cm. Asimismo, se determina la altura H_2 , con un valor de H_2 igual a 27.6 cm.

Una vez determinados los valores mencionados, se prosiguió con la prueba de permeabilidad. A continuación, se muestran los resultados de los tiempos de recorrido del agua de H_1 a H_2 en dos lotes de andamios (tabla 6.1, tabla 6.2).

Tabla 6.1. Valores de tiempo de permeabilidad de los andamios del lote 1. Seis repeticiones por andamio.

LOTE 1										
Andamio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Prueba	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)
1	76	72	82	82	66	60	70	70	80	73
2	78	70	84	83	66	59	71	70	86	71
3	76	60	84	84	67	59	71	73	83	71
4	75	65	83	85	65	60	68	71	86	74
5	76	63	82	83	66	58	70	71	84	73
6	77	68	84	84	65	58	68	72	84	71
Promedio	76.33	66.33	83.16	83.5	65.83	59	69.66	71.16	83.83	72.16
Desviación estándar	1.03	4.50	0.98	1.04	0.75	0.89	1.36	1.16	2.22	1.32

Por otro lado, se debe registrar la temperatura del agua destilada empleada en las pruebas, la cual fue de 20°C. Con dicho valor se obtuvieron los datos de densidad (998.2 kg/m³) y viscosidad (0.001002 kg/m*s) correspondientes con lo reportado.

Tabla 6.2. Valores de tiempo de permeabilidad de los andamios del lote 2. Seis repeticiones por andamio.

LOTE 2										
Andamio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Prueba	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)	Tiempo (s)
1	70	74	67	66	55	84	53	80	63	57
2	70	75	68	67	54	85	53	79	63	59
3	72	70	66	64	54	84	51	79	64	59
4	68	72	68	65	53	84	52	80	65	59
5	69	72	68	64	54	83	52	81	62	57
6	69	71	68	65	55	83	53	80	65	60
Promedio (t2)	69.66	72.33	67.5	65.16	54.16	83.83	52.33	79.83	63.66	58.50
Desviación estándar	1.36	1.86	0.83	1.16	0.75	0.75	0.81	0.75	1.21	1.22

Los andamios del lote 2, fueron sometidos a la prueba de permeabilidad una semana después del lote 1. Se mantuvieron las mismas condiciones durante todo el experimento. Manteniendo constante además H_1 y H_2 de las pruebas del lote 1.

Además, se registra la temperatura del agua empleada, con un valor de 19°C. Con ello, se obtuvieron los valores de densidad (998.38 kg/m³) y viscosidad (0.001003 kg/m*s) correspondientes.

Para los cálculos de la conductividad hidráulica, se sustituyeron los promedios de los tiempos de las tablas 1 y 2, para cada andamio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.3.

Tabla 6.3. Resultados del cálculo de conductividad hidráulica para los andamios de lotes 1 y 2. Datos mostrados en mm/s y su conversión a m/s.

Lote 1			Lote 2		
Andamio	Conductividad hidráulica (mm/s)	Conductividad hidráulica (m/s)	Andamio	Conductividad hidráulica (mm/s)	Conductividad hidráulica (m/s)
1	0.00165	1.65×10^{-6}	1	0.00181	1.81×10^{-6}
2	0.00190	1.9×10^{-6}	2	0.00174	1.74×10^{-6}
3	0.00151	1.51×10^{-6}	3	0.00187	1.87×10^{-6}
4	0.00151	1.51×10^{-6}	4	0.00193	1.93×10^{-6}
5	0.00191	1.91×10^{-6}	5	0.00233	2.33×10^{-6}
6	0.00214	2.14×10^{-6}	6	0.00151	1.51×10^{-6}
7	0.00181	1.81×10^{-6}	7	0.00241	2.41×10^{-6}
8	0.00177	1.77×10^{-6}	8	0.00158	1.58×10^{-6}
9	0.00150	1.5×10^{-6}	9	0.00198	1.98×10^{-6}
10	0.00175	1.75×10^{-6}	10	0.00216	2.16×10^{-6}

Con los resultados de la tabla 6.3, se sustituyeron los valores de la conductividad hidráulica (en m/s), para el cálculo correspondiente de la permeabilidad de cada andamio. Los resultados se muestran a continuación (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Resultados de permeabilidad para los 10 andamios por lote.

Lote 1		Lote 2	
Andamio	Permeabilidad (m^2)	Andamio	Permeabilidad (m^2)
1	1.693×10^{-13}	1	1.907×10^{-13}
2	1.949×10^{-13}	2	1.837×10^{-13}
3	1.555×10^{-13}	3	1.969×10^{-13}
4	1.548×10^{-13}	4	2.039×10^{-13}
5	1.964×10^{-13}	5	2.387×10^{-13}
6	2.191×10^{-13}	6	1.524×10^{-13}
7	1.856×10^{-13}	7	2.471×10^{-13}
8	1.817×10^{-13}	8	1.62×10^{-13}
9	1.542×10^{-13}	9	2.013×10^{-13}
10	1.792×10^{-13}	10	2.21×10^{-13}

Análisis de resultados

De los resultados anteriores, se realiza la estadística descriptiva correspondiente, mostrada en la tabla 6.5 y la gráfica de caja (figura 6.14).

Tabla 6.5. Estadística descriptiva de los valores de permeabilidad obtenidos de ambos lotes.

	Lote 1	Lote 2
Promedio	$1.791 \pm 0.21 \times 10^{-13} \text{ m}^2$	$1.978 \pm 0.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2$
Mínimo	1.542×10^{-13}	1.542×10^{-13}
Máximo	2.191×10^{-13}	2.471×10^{-13}

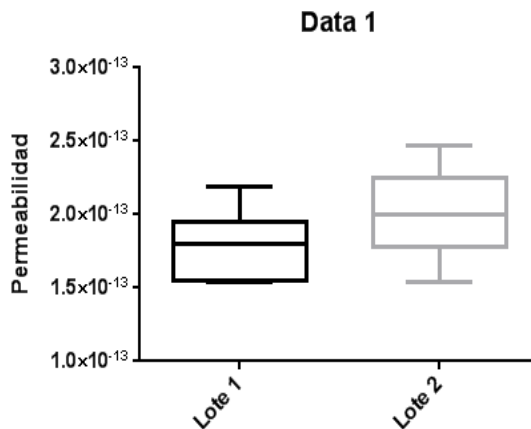


Figura 6.15. Gráfica de caja. Se muestran los mínimos y máximos para cada lote. Así como los valores de la mediana, cuartiles uno y tres.

Se utiliza la prueba “t de student”, mediante el software GraphPad Prism 6.0. para evaluar si existen cambios significativos entre las medias de permeabilidad obtenidas por lote. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$).

El valor medio global de permeabilidad obtenida en los andamios con intervalo de confianza de 95%, fue de $2.089 \pm 0.166 \times 10^{-13} \text{ m}^2$.

Interpretación de los resultados y conclusión

Al comparar los valores de permeabilidad obtenidos en ambos lotes ($1.791 \pm 0.214 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ y $1.978 \pm 0.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2$), con lo reportado en la literatura se observa que: se encuentran en el mismo orden de magnitud. Hwang *et. al* reportaron una permeabilidad de: $1.064 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ para hidrogeles de alginato (Hwang, Sant et al, 2010). Wang *et. al* reportaron una permeabilidad desde: $2.2 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ hasta $48.7 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, para andamios compuestos de matriz extracelular con cartílago auricular de hidroxiapatita (Wang, Meng et al, 2014). Sin embargo, no se encuentra reportado en la literatura claramente qué valor de permeabilidad es mejor. Por un lado, una menor permeabilidad promueve incremento en la producción de matriz cartilaginosa por los condrocitos, incrementando el contenido de agrecano y colágeno II. Mientras que una mayor permeabilidad, es más favorable para la diferenciación de células troncales hacia condrocitos (Kemppainen & Hollister, 2010), y neuronales (Lee, Rich et al, 2015).

Aunque no se cuente con una referencia sobre qué permeabilidad es más favorable para el cultivo celular, respecto a: adhesión, proliferación o viabilidad. El valor obtenido se encuentra en el rango reportado por otros autores, quienes han realizado cultivos con otras líneas celulares con éxito, por lo que se espera que los andamios fabricados permitan el cultivo celular.

Problema 6.2 Cuantificación de daño tisular y su análisis estadístico

*Nohra Elsy Beltrán Vargas
Eduardo Peña Mercado
Mario García Lorenzana*

En este ejemplo, trabajaremos la aplicación de la estadística para resolver un problema de análisis de datos generados a partir de un modelo de experimentación en animales, donde se busca cuantificar el daño provocado en el tejido de un órgano en particular. Esto surge a partir de investigaciones que se están desarrollando actualmente entre la UAM Cuajimalpa e Iztapalapa, así como de aplicaciones en el área biomédica.

Problema: Realizar una cuantificación de daño tisular a partir del análisis de imágenes histológicas obtenidas de un modelo experimental en ratas.

Antecedentes

Los tejidos y las técnicas para analizarlos

En los organismos pluricelulares pueden distinguirse distintos niveles de organización. Los tipos más sencillos contienen un número de células relativamente bajo. Si todas estas, son más o menos semejantes, le damos al organismo el nombre de colonia celular. Si se hallan presentes dos o más grupos distintos de células, en general, cada uno de estos grupos constituye un TEJIDO.

Los tejidos son: asociaciones de células con características estructurales y funcionales similares. En organismos que poseen mayor complejidad estructural (como es el caso del hombre), no sólo hay varios tejidos; sino que éstos, además, se reúnen en una o más unidades llamadas órganos (por ejemplo el estómago, el corazón, la piel y los pulmones entre otros). Por otra parte, los organismos más complejos tienen grupos de órganos reunidos en sistemas, como sería el caso del: respiratorio, digestivo, cardiovascular y nervioso, entre otros.

Independientemente de las diferentes formas y funciones que adoptan los tejidos, presentan siempre características comunes que nos permiten agruparlos en cuatro tipos:

Tejido epitelial. Las células que constituyen al tejido epitelial se caracterizan por estar fuertemente unidas entre sí, por su gran capacidad de regeneración y reparación. El tejido conjuntivo no sólo está constituido por células sino por abundantes elementos que estas producen. Entre estos se encuentran las fibras y un material viscoso llamado matriz extracelular. Entre las fibras podemos mencionar a la colágena. Como ejemplo de células del tejido conectivo están las de la sangre, del cartílago y hueso. Al igual que el epitelial, el tejido conjuntivo tiene una gran capacidad de regeneración y reparación.

Las células del tejido muscular, tienen como características distintivas su gran tamaño y compleja estructura que les permite realizar movimientos muy diversos. Las unidades de este tejido tienen menor capacidad de regeneración y reparación. Finalmente, el nervioso está constituido por células con una estructura muy compleja, que les permite realizar funciones de esta naturaleza y muy importantes, dentro de órganos como el cerebro. Al igual que el tejido muscular, el nervioso presenta una capacidad de regeneración y reparación muy limitada (Ross & Pawlina, 2007).

Con la ayuda del microscopio y de la técnica histológica se estudian los tejidos para conocerlos de manera detallada, en cuanto a su estructura, organización y función. Se pueden distinguir de esta manera los diferentes tipos de células que constituyen a los tejidos.

La técnica histológica, es una serie de procedimientos que se aplican a los tejidos para poder observarlos con el microscopio. A partir de la aplicación de los colorantes Hematoxilina y Eosina, se logran contrastar las estructuras celulares y tisulares de diferente composición química.

La histopatología, involucra el estudio de las anomalías que se detecten a partir de la aplicación de la técnica histológica; para realizar un diagnóstico de una patología determinada. Las muestras de los tejidos, se obtienen en la mayoría de los casos de biopsias (pequeño fragmento del tejido a estudiar) de algún organismo.

Lesión por isquemia-reperfusión

La isquemia se refiere a la ausencia de flujo sanguíneo hacia algún órgano determinado del cuerpo. Cuando las células no pueden mantener una adecuada síntesis de ATP, el existente es degradado en sus componentes de: adenosina, luego a inosina y finalmente hipoxantina. Mientras la isquemia se alargue, la hipoxantina se acumula. El pH intracelular, disminuye durante la isquemia debido al metabolismo anaerobio con acumulación de

lactato. Las enzimas y proteínas reguladoras intracelulares, son dañadas conduciendo a la disfunción celular. La disminución de ATP inactiva las bombas que dependen de esta molécula, permitiendo la salida de potasio, con la entrada de sodio y cloro; que causa edema celular agudo. El incremento en calcio, parece que se debe a varias causas; incluyendo la disminución en la extrusión por la inactivación de las bombas membranales dependientes de ATP, liberación de calcio este elemento a partir de los organelos.

Este incremento en el calcio intracelular, es uno de los eventos tempranos en la lesión por isquemia-reperusión I/R, donde el daño es dependiente de la duración y el grado de incremento. El aumento en el calcio citosólico causa apoptosis y necrosis en la célula (McMichael & Moore, 2004).

La reperusión de los tejidos isquémicos paradójicamente exagera el proceso de lesión, provocando la liberación de radicales libres y mediadores proinflamatorios, así como la atracción de leucocitos a la zona afectada (Kobata, Kotani et al, 2007).

La lesión por isquemia-reperusión, (I/R) es una compleja cascada de eventos que involucran una multitud de procesos fisiopatológicos. Estos incluyen: la activación de neutrófilos, plaquetas, citocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), sistema de coagulación, endotelio y el sistema enzimático xantina – óxido – reductasa. Esto puede conducir eventualmente al daño celular, muerte celular, incremento en la permeabilidad vascular, necrosis tisular y disfunción orgánica múltiple. La muerte celular por necrosis o apoptosis es desencadenada por las sustancias liberadas durante la I/R (McMichael & Moore, 2004).

Para obtener mayor información sobre el daño tisular generado por isquemia- reperusión en los tejidos, es importante evaluar cuantitativamente características histopatológicas propias del daño celular y proceso inflamatorio temprano.

Solución

Para proponer las variables a analizar para medir en las imágenes histológicas, se inició con la revisión bibliográfica de índices de cuantificación de daño propuestos por otros autores en diferentes modelos experimentales.

A partir de la revisión, se definieron dos variables a medir en los cortes histológicos que se tienen de ratas macho de la cepa “Wistar” criadas en bioterio para experimentación.

Protocolo experimental

Se obtuvieron muestras (biopsias) de tejido de ratas de 4 grupos: control, isquemia (30 min) e isquemia-reperfusión (30 min y 60 min). Se incluyeron 2 ratas en cada grupo. El tejido fue procesado mediante la técnica histológica de rutina, se obtuvieron cortes longitudinales y transversales de cada una de las muestras; se colocaron en 3 laminillas con 3 cortes de 4 μm de espesor de cada uno de los planos, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Se observaron las laminillas al microscopio para generar una base de datos de las áreas y zonas que presentan daño de acuerdo a las variables: área del lumen glandular y presencia de áreas de erosión epitelial.

Ahora se definen las variables de análisis:

VARIABLES DEPENDIENTES (RESPUESTA)

- Área del lumen glandular (variable cuantitativa)
- Presencia de áreas de erosión epitelial (variable cualitativa)

FACTORES ESTUDIADOS

- Grupo: Control, Isquemia, Isquemia – perfusión

FACTORES CONTROLABLES

- Técnica histológica
- Técnica de tinción hematoxilina-eosina

FACTORES NO CONTROLABLES

- Calidad de los reactivos utilizados en la técnica histológica y en la tinción
- Grosor en todos los cortes del tejido incluido
- Condiciones de microscopios para el análisis de las laminillas

Análisis estadístico

Se inicia con la descripción de las variables de interés, que en este caso son: área del lumen glandular, y presencia de áreas de erosión epitelial. Para esto utilizamos el software NCSS 8.

Primero, se realiza la estadística descriptiva de la variable cuantitativa “área del lumen glandular”, que incluye medidas de tendencia central, de dispersión y de posición relativa (Gutierrez & De la vara 2012; Triola, 2013).

En la tabla 6.6 se describe esta variable para los diferentes grupos de estudio.

Tabla 6.6. Descripción del área del lumen glandular en μm^2 para los diferentes grupos de estudio

Grupo	Media \pm DE (μm^2)	Mediana (μm^2)	Mínimo (μm^2)	Máximo (μm^2)	Rango (μm^2)
Control	113.58 \pm 83.63	98.42	4.05	612.71	608.66
Isquemia	165.01 \pm 107.01	138.70	17.78	975.26	957.48
I/R 30 min	310.63 \pm 143.99	290.24	33.53	1 557.36	1 523.83
I/R 60 min	301.01 \pm 163.38	279.19	48.07	5 467.59	5 419.52

En la gráfica de caja, se describen las variables de posición relativa: cuartiles Q1, Q2 y Q3, así como la mediana de los datos. Se puede observar fácilmente que se tienen varios valores atípicos, en especial hay uno en el grupo de I/R de 60 min alrededor de 5 500 μm^2 .

Estos análisis cuantitativos y gráficos, permiten evidenciar la gran dispersión que tienen los datos analizados; así como la diferencia entre la media y la mediana debido a esos valores atípicos que se observan gráficamente en la figura 6.16.

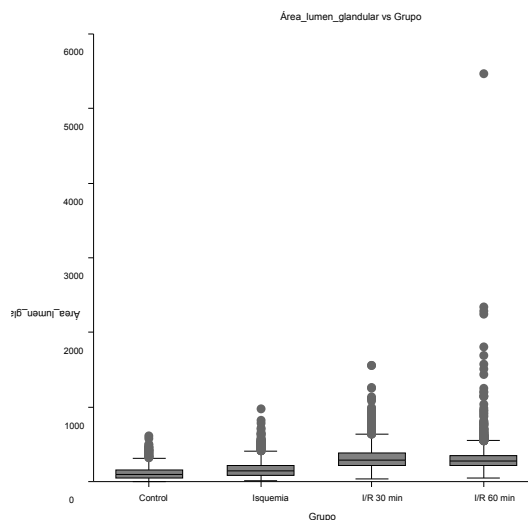


Figura 6.16. Gráfica de caja del área del lumen glandular en los cuatro grupos de estudio.

Lo anterior nos llevó a un análisis de la base de datos que se tenía para determinar el porqué de los valores atípicos. Debido al daño glandular que se genera en la mucosa en condiciones de I/R, algunas de estas pierden su integridad y el lumen glandular se comunica con el de las glándulas adyacentes; lo que se refleja en el incremento del área del lumen glandular que se observa especialmente en condiciones de I/R 60min. Generando una mayor cantidad de datos atípicos (“outliers”). Para disminuir esta dispersión, se eliminaron los datos en los cuales el área del lumen de una o más glándulas estuviera comunicado.

Entendiendo lo que ocurre teóricamente en el modelo propuesto, se procedió a realizar la corrección en las medidas obtenidas para evitar áreas tan grandes por la comunicación entre glándulas adyacentes. Se modificó la base de datos y se procedió al análisis de datos.

Nuevamente, se realizó la estadística descriptiva, obteniendo los siguientes resultados: los cuales se resumen en la tabla 6.7. Ahora las desviaciones estándar (DE) disminuyen, sin cambiar el orden de magnitud de los resultados:

Tabla 6.7. Descripción del área del lumen glandular en μm^2 para los diferentes grupos de estudio, con la corrección de los valores atípicos generados por la comunicación entre glándulas adyacentes.

Grupo	Media \pm DE (μm^2)	Mediana (μm^2)	Mínimo	Máximo	Rango
Control	112.69 \pm 82.09	97.87	4.05	612.71	608.66
Isquemia	163.94 \pm 103.81	138.65	19.29	821.53	802.24
I/R 30 min	304.46 \pm 126.55	288.55	40.27	894.98	854.71
I/R 60 min	291.29 \pm 102.82	270.36	48.07	793.55	745.48

La gráfica de caja en la figura 6.17, muestra que las áreas son menores de $1000 \mu\text{m}^2$, sin embargo, las de los grupos de I/R siguen siendo casi el doble de las del grupo control y el grupo de isquemia:

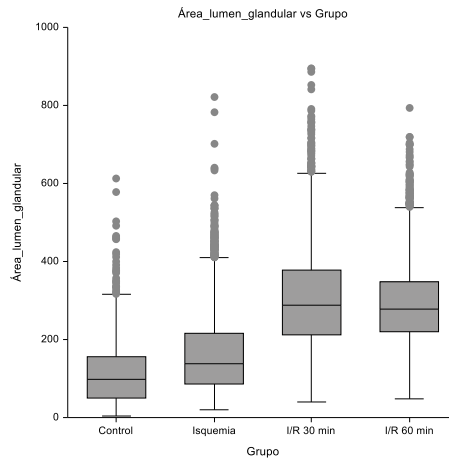


Figura 6.17. Gráfica de caja del área del lumen glandular en los cuatro grupos de estudio, con la corrección de los valores atípicos generados por la comunicación entre glándulas adyacentes.

Se puede observar que con la corrección de los valores atípicos, los registros máximos y los rangos de los diferentes grupos; disminuyen, especialmente para los grupos de I/R, que eran los que presentaban unos valores completamente fuera del rango. La estadística descriptiva nos ayudó para poder depurar la base de datos, y a partir de esto, ahora sí, proceder a realizar una prueba de hipótesis para evaluar si hay cambios estadísticamente significativos entre los grupos de estudio.

H_0 = área del lumen glandular media de todos los grupos son iguales.

H_a = área del lumen glandular media de todos los grupos no son iguales.

Una vez que se han descrito los datos, se debe realizar una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene; para evaluar la igualdad de estas y definir el método estadístico a aplicar, para el análisis de la prueba de hipótesis. Como no se encontró igualdad de varianzas, se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida por una prueba post hoc T3 de Dunnet, definiendo un nivel de significancia de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Hay que recordar que la prueba Kruskal-Wallis, solamente nos dice si hay diferencias significativas entre todos los grupos, pero no especifica entre qué grupos se presentan las desigualdades; por lo que la prueba post hoc de Dunnet nos permite identificar entre qué

grupos específicamente se encuentran las diferencias respecto al grupo control. Los resultados del análisis estadístico (tabla 6.8), permitieron identificar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales con respecto al control, siendo I/R 30 min e I/R 60 min los que presentan el mayor incremento en el área del lumen glandular con respecto al control. Se puede observar que el grupo I/R 30 min es el que presenta el mayor incremento. En el caso de la segunda variable de interés, el análisis estadístico para “erosión epitelial” se realizó a partir una puntuación asignada arbitrariamente donde: 0 significa sin erosión, 1 significa erosión del epitelio superficial, 2 significa erosión de la porción superior.

Tabla 6.8. Resultados del análisis estadístico.

Grupos	% sin erosión (0)	% erosión epitelio superficial (1)	% erosión porción superior (2)
Control	88.89	11.11	0
Isquemia	74.07	25.93	0
I/R 30 min	7.41	51.85	40.74
I/R 60 min	0	40.74	59.26

Para realizar la prueba de hipótesis, al ser una variable nominal, se hizo **una prueba estadística de Chi – cuadrada**, definiendo un nivel de significancia de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Ahora las hipótesis son:

H_0 = los porcentajes de erosión epitelial de todos los grupos son iguales.

H_a = los porcentajes de erosión epitelial de todos los grupos no son iguales.

El análisis estadístico, muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) en la erosión epitelial y de la porción superior en condiciones de I/R de ambos grupos; siendo el grupo I/R 60 min el que presenta el mayor porcentaje de erosión (figura 6.18).

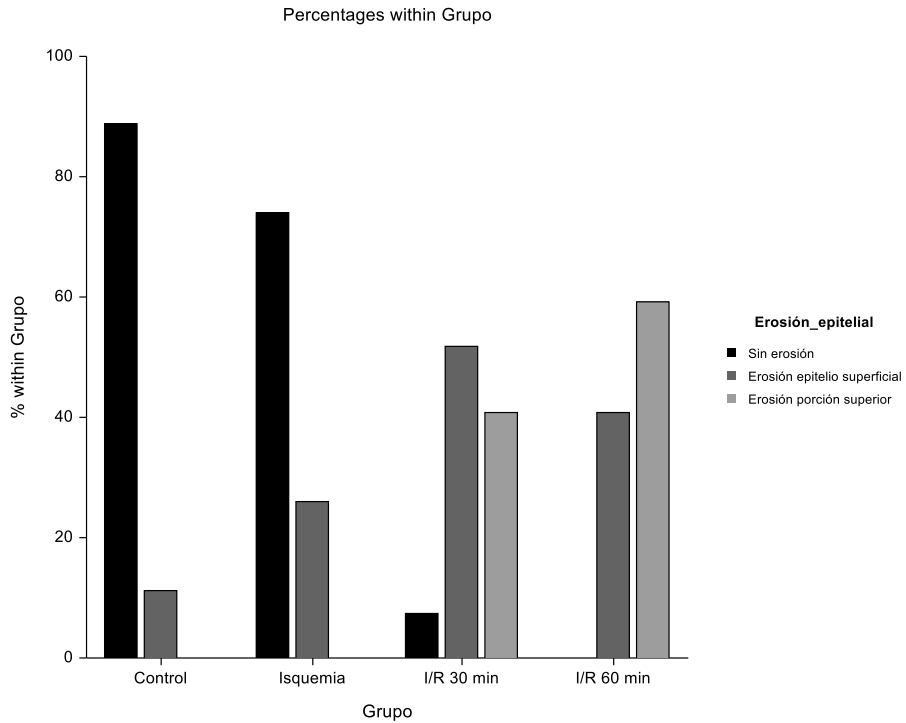


Figura 6.18. Representación gráfica del porcentaje de erosión epitelial en los cuatro grupos de estudio.

Conclusiones

A partir de las variables propuestas para cuantificar el daño tisular, fue posible identificar cambios entre los grupos de estudio. Presentando mayor área de lumen glandular y mayor porcentaje de erosión epitelial en los grupos de I/R como era de esperarse. Ya que como se mencionó al momento de presentar el tema, en la literatura se reporta que la reperfusión de los tejidos isquémicos exagera el proceso de lesión, lo cual se logró demostrar en el análisis estadístico propuesto.

Bibliografía

- Chan, B. P. & K. W. Leong (2008). *Scaffolding in tissue engineering: general approaches & tissue-specific considerations*. Eur Spine J 17 Suppl 4: pp. 467-479.
- Chiu, C. L., V. Hecht, H. Duong, B. Wu & B. Tawil (2012). *Permeability of three-dimensional fibrin constructs corresponds to fibrinogen & thrombin concentrations*. BioResearch open access 1(1): pp. 34-40.
- Gutierrez, H. & R. De la vara (2012). *Analisis y diseño de experimentos*.
- Hwang CM, Sant S, Masaeli M, Kachouie NN, Zamanian B, Lee SH, *Khademhosseini A: Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering*. Biofabrication 2010, 2(3): pp. 035003.
- Khademhosseini (2010). *Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering*. Biofabrication 2(3): pp. 035003.
- Kemppainen, J. M. & S. J. Hollister (2010). *Differential effects of designed scaffold permeability on chondrogenesis by chondrocytes & bone marrow stromal cells*. Biomaterials 31(2): 279-287.
- Kobata, A., T. Kotani, Y. Komatsu, K. Amagase, S. Kato & K. Takeuchi (2007). *Dual action of nitric oxide in the pathogenesis of ischemia/reperfusion-induced mucosal injury in mouse stomach*. Digestion 75(4): pp. 188-197.
- Kroemer, K. H., H. J. Kroemer & K. Kroemer-Elbert (2010). *Engineering Physiology: Bases of Human Factors Engineering*. Ergonomics, New York.
- Lee, M. K., M. H. Rich, K. Baek, J. Lee & H. Kong (2015). *Bioinspired tuning of hydrogel permeability-rigidity dependency for 3D cell culture*. v.5 Scientific Reports.
- Marieb, E. N. & K. Hoehn (2007). *Human anatomy & physiology*, Pearson Education.
- McMichael, M. & R. M. Moore (2004). *Ischemia-reperfusion injury pathophysiology, part I*. Journal of Veterinary Emergency & Critical Care 14(4): pp. 231-241.
- Nugent, H. M. & E. R. Edelman (2003). *Tissue engineering therapy for cardiovascular disease*. Circ Res 92(10): 1068-1078.

- O'Brien, F. J. (2011). *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Materials today* 14(3): 88-95.
- Pennella, F., G. Cerino, D. Massai, D. Gallo, G. F. D. U. Labate, A. Schiavi, M. A. Deriu, A. Audenino & U. Morbiducci (2013). *A survey of methods for the evaluation of tissue engineering scaffold permeability*. *Annals of biomedical engineering* 41(10): 2027-2041.
- Radisic, M. & K. L. Christman (2013). *Materials science & tissue engineering: repairing the heart*. *Mayo Clin Proc* 88(8): 884-898.
- Ross, M. H. & W. Pawlina (2007). *Histología*, Ed. Médica Panamericana.
- Saltzman, W. M. (2009). *Biomedical engineering: bridging medicine & technology*, Cambridge University Press.
- Sell, S., C. Barnes, D. Simpson & G. Bowlin (2008). *Scaffold permeability as a means to determine fiber diameter & pore size of electrospun fibrinogen*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 85(1): 115-126.
- Triola, M. (2013). *Estadística México*: Pearson Educación.
- Truscello, S., G. Kerckhofs, S. Van Bael, G. Pyka, J. Schrooten & H. Van Oosterwyck (2012). *Prediction of permeability of regular scaffolds for skeletal tissue engineering: a combined computational & experimental study*. *Acta biomaterialia* 8(4): pp. 1648-1658.
- Wang, Y., H. Meng, X. Yuan, J. Peng, Q. Guo, S. Lu & A. Wang (2014). *Fabrication & in vitro evaluation of an articular cartilage extracellular matrix-hydroxyapatite bilayered scaffold with low permeability for interface tissue engineering*. *Biomedical engineering online* 13(1): 80.
- Yarmush, M. L., M. Toner, R. Plonsey & J. D. Bronzino (2003). *Biotechnology for biomedical engineers*, CRC Press.

Lecturas recomendadas

Palsson B., Bhatia S. *Tissue Engineering*. Pearson Prentice Hall Bioengineering. 2004.

Bronzino, J. *Tissue Engineering*. Elsevier. 2008.

Hu, Wei-Shou. *Cell culture bioprocess engineering*. WSH. 2012.

Capítulo 7

Técnicas analíticas de caracterización y separación de biomoléculas

*Maribel Hernández Guerrero**

*Izlia Jazheel Arroyo Maya***

*Gabriel Viguera Ramírez****

La química de la vida: ¿qué son las biomoléculas?

Las células están constituidas por moléculas biológicas o macromoléculas —polímeros de alta masa molecular—, que se forman cuando se unen o condensan muchas estructuras orgánicas más pequeñas que se denominan monómeros, los cuales poseen masas moleculares iguales o inferiores a 500 daltons. Las subunidades monoméricas que conforman las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos se unen por reacciones de sustitución nucleofílica o de condensación. Esta última, tiene lugar por la remoción de una molécula de agua para generar una cadena de “residuos”. En algunos casos, como el de las proteínas y los ácidos nucleicos, el orden de unión de los diferentes residuos tiene una gran importancia; en otros, por ejemplo, el de los carbohidratos, en donde el residuo se repite muchas veces. Las propias macromoléculas pueden formar después estructuras supramoleculares, dando lugar a unidades funcionales de mucha complejidad (tabla 7.1).

* Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: mhernandez@correo.cua.uam.mx

** Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: iarroyo@correo.cua.uam.mx

*** Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México.

Tabla 7.1. Composición macromolecular total. Abundancia de los diferentes constituyentes celulares.

Macromolécula	Porcentaje en peso seco total	Peso por célula (fg)	Peso molecular característico (Da)	Número de moléculas por célula
Proteína	55	165	3×10^4	3 000 000
ARN	20	60		
23 S rARN		32	1×10^6	20 000
16 S rARN		16	1×10^5	20 000
5 S rARN		1	1×10^4	20 000
transferencia		9	1×10^4	200 000
mensajero		2	1×10^6	1 400
ADN	3	9	1×10^9	2
Lípidos	9	27	800	20 000 000
Lipopolisacáridos	3	9	8 000	1 000 000
Peptidoglicanos	3	9	$(1000)_n$	1
Glucógeno	3	9	1×10^6	4 000
Metabolitos y cofactores	3	9		
Iones inorgánicos	1	3		
Peso seco total	100	300		
Agua (70% de la célula)		700		
Peso celular total		1 000		

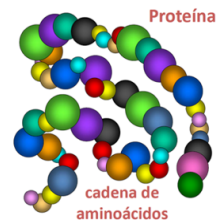
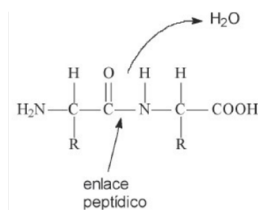
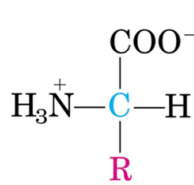
Proteínas

Existen 20 aminoácidos comunes en todas las células. Estos se caracterizan por tener, al menos dos grupos funcionales —amino y carboxilato— (figura 7.1). Estos grupos se condensan durante la síntesis de proteínas para formar un enlace peptídico (figura 7.2) que da como resultado un polipéptido o una proteína (figura 7.3). Estas son las macromoléculas biológicas más abundantes, estando presentes en todas las células y en cualquier parte de la misma (figura 7.4). Las proteínas también presentan una gran variedad de formas y funciones; por

ejemplo, en una sola célula se pueden encontrar miles de clases diferentes, que varían en tamaño desde péptidos relativamente pequeños, hasta polímeros enormes de masas moleculares del orden de millones de Da.

Las proteínas son biopolímeros grandes, muchas de las cuales funcionan como enzimas, otras sirven como componentes estructurales importantes, receptores de señales, o transportadores, llevando sustancias específicas hacia adentro o hacia fuera de las células. Su estructura está determinada, en gran parte, por la secuencia de los aminoácidos que se unen. Esta a su vez, está codificada por los genes.

La función de una proteína depende de su estructura apropiada en tres dimensiones. Además se pueden asociar para formar estructuras más grandes. Este siguiente nivel de organización, genera complejos que pueden llevar a cabo una serie de reacciones, o para desarrollar nanoestructuras para diversas aplicaciones tecnológicas.

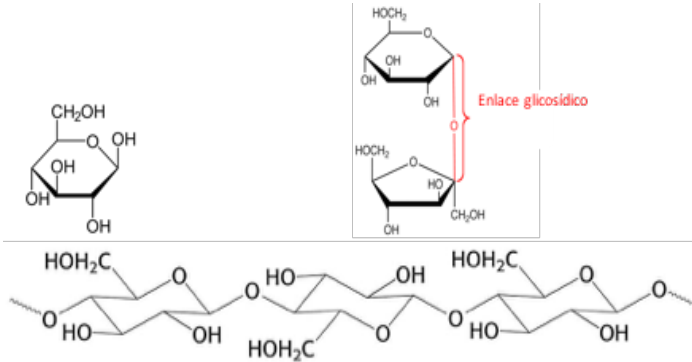


Figuras: 7.1. Aminoácido 7.2. Enlace peptídico

7.3. Proteína

Carbohidratos

Los carbohidratos son un grupo de biomoléculas abundante y diverso, que comparten la propiedad común de estar compuestos de carbono, oxígeno, e hidrógeno. Estos incluyen azúcares sencillos (figura 7.4), sus polímeros —unidos a través del enlace glucosídico— (figura 7.5), así como otros derivados de azúcar, los cuales contienen varios grupos oxhidrilo. Por ejemplo, la celulosa, uno de los componentes principales de la pared celular de las plantas, es la macromolécula biológica más abundante (figura 7.6). Otros polímeros de carbohidrato, desempeñan también un papel en la estructura de las células y los tejidos; algunos como el glucógeno y almidón, sirven como moléculas de almacenamiento.

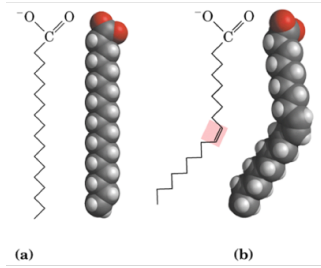


Figuras: 7.4. Monómero de glucosa 7.5. Enlace glucosídico; 7.6. Macromolécula de celulosa

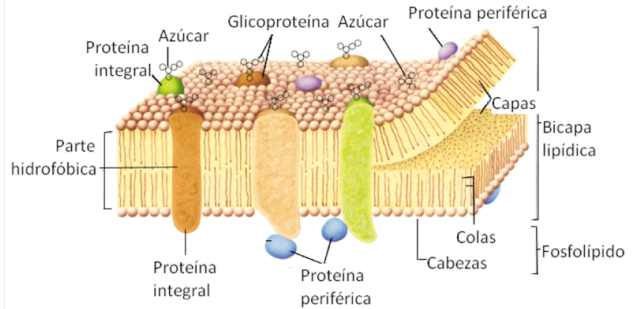
Lípidos

En la naturaleza se encuentran muchos tipos de lípidos, los más sencillos son los ácidos grasos (figura 7.7). Estos son hidrocarburos de cadena larga con un grupo carboxilo en uno de los extremos. Los ácidos grasos se encuentran con más frecuencia, como una parte de moléculas más grandes que se denominan glicerosfolípidos, los cuales consisten en glicerol 3-fosfato y dos grupos acilos grasos (figura 7.7). Los glicerosfolípidos son componentes importantes de las membranas biológicas. Las moléculas individuales de lípidos no se consideran macromoléculas, sin embargo, la asociación no covalente de un gran número de estas produce estructuras de gran tamaño. Las membranas celulares se construyen a partir de enormes agregados de millones de moléculas de lípido (figura 7.8).

Los lípidos de las membranas tienen por lo regular una cabeza polar, hidrofílica capaz de interactuar con un ambiente acuoso; y una cola no polar, hidrofóbica. Las colas hidrofóbicas de tales lípidos se asocian, generan láminas de bicapas lipídicas, las cuales forman las membranas. Estas sirven para separar una célula, o un componente dentro de esta, o de su ambiente. La membrana que rodea a la célula, a la que se le llama membrana plasmática, tiene proteínas enclavadas en la bicapa lipídica. Estas proteínas sirven como canales para la entrada de nutrientes y la salida de desechos, mientras que otras catalizan reacciones que tienen lugar específicamente en la superficie de la célula. Las membranas intracelulares también contienen proteínas que desempeñan diversas funciones biológicas.



Figuras: 7.7. Ácido graso



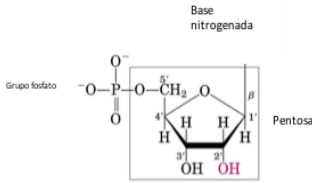
7.8. Membrana biológica

Ácidos nucleicos

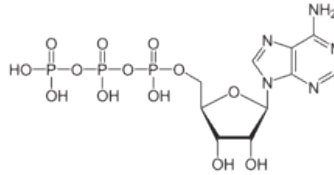
Los ácidos nucleicos son polímeros formados de monómeros que se denominan nucleótidos. Estos contienen un azúcar, una base nitrogenada heterocíclica, y al menos un grupo fosforilo (figura. 7.9). El azúcar de los ribonucleótidos es el carbohidrato de cinco carbonos, ribosa; el de los desoxirribonucleótidos es su derivado, la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas de los nucleótidos pertenecen a dos familias, que se conocen como purinas y pirimidinas. La estructura del nucleótido adenosin trifosfato (ATP) (figura. 7.10); además de servir como un bloque de construcción de los ácidos nucleicos, es el proveedor central de energía en las células vivas.

Para formar los ácidos nucleicos, los nucleótidos se unen por medio de un enlace covalente que se forma entre un grupo fosforilo del nucleótido y un grupo oxhidrilo de un azúcar de otro nucleótido. Estos enlaces dan como resultado la formación de una estructura que consiste en azúcares y fosfatos que se alternan. En el ADN las bases de dos cadenas complementarias interactúan para formar una organización helicoidal (figura. 7.11). La secuencia específica de los pares de bases en el ADN es la que contiene la información genética.

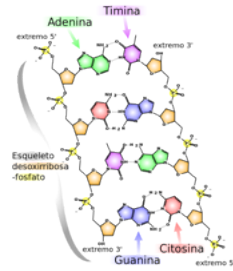
Los ácidos nucleicos pueden ser de gran longitud, algunos cromosomas humanos, por ejemplo, consisten en moléculas de ADN de más de cien millones de nucleótidos individuales. Las bacterias, las cuales tienen menos genes, contienen, casi siempre, una molécula de ADN más pequeña. En la mayor parte de estas, el cromosoma sencillo es circular, esto es, los extremos de la molécula están unidos.



Figuras: 7.9. Nucleótido



7.10. ATP



7.11. Polinucleótido ADN

Aplicación tecnológica de las biomoléculas:

¿qué es la bionanotecnología?

Las aplicaciones tecnológicas donde pueden emplearse biomoléculas son muy diversas, un ejemplo de ello es la bionanotecnología, que a su vez se deriva de la nanotecnología. Estos dos conceptos involucran tanto investigación como desarrollo de tecnología en una escala nanométrica. A continuación, se mencionan algunas tecnologías que involucran escalas de trabajo pequeñas para tratar de definir el alcance de la bionanotecnología.

La **química** fue la primera ciencia en manipular las moléculas, inició cuando los primeros seres humanos empezaron a cocinar sus alimentos. En la actualidad, los químicos diseñan moléculas, realizando síntesis extensas y controladas para obtenerlas. La química difiere de la nanotecnología porque ésta no trabaja a nivel de moléculas individuales.

La **fotolitografía** es ampliamente usada en la creación de hardware para computadoras, y el creciente campo de los sistemas microelectromecánicos está aplicando estas tecnologías para la creación de las máquinas a microescala. Toda nuestra información y comunicación tecnológica se basa en estos métodos. Es una técnica a escala muy reducida, a sus límites más finos.

La **biotecnología** aprovecha los procesos biológicos, y los utiliza para beneficio del ser humano. Por ejemplo, el uso de enzimas purificadas para cortar y pegar instrucciones genéticas en células específicas. El conocimiento de los detalles atómicos en este proceso es irrelevante, y esto es lo que hace distinta a la biotecnología de la nanotecnología.

La **nanotecnología** o “**nanotecnología molecular**”, ha sido definida como: la ingeniería y manufactura a escala nanométrica con precisión atómica. Una descripción más generalizada

es: la manipulación de la materia con al menos una dimensión del tamaño de entre 1 – 100 nm. Esta tecnología abarca un campo muy amplio que incluye diferentes disciplinas científicas como ciencia de superficies, química orgánica, biología molecular, física de los semiconductores, microfabricación, etc.

La **bionanotecnología** es una disciplina derivada de la nanotecnología –ingeniería y fabricación a escala nanométrica- pero que utiliza materiales biológicos o biomoléculas para el diseño y desarrollo de diversas estructuras, por ejemplo, las nanopartículas biopoliméricas. Estas nanopartículas (NPs) pueden ser usadas en diversas industrias como la farmacéutica y de alimentos. Las NPs poseen un tamaño de partícula que va de los 20 a los 1 000 nm y consisten de un centro polimérico (formado por un polímero o una mezcla de ellos), en el cual diferentes compuestos bioactivos –con efectos benéficos para la salud humana- pueden ser inmovilizados o atrapados (figura. 7.12). Las limitaciones para el uso de estas NPs poliméricas en la industria de los alimentos, radica en la preocupación de que estas pueden presentar riesgos para la salud de las personas expuestas por largos períodos. En respuesta a esta preocupación, solo componentes de grado alimenticio son seleccionados para la síntesis de las NPs, por ejemplo, polímeros naturales, surfactantes biodegradables y biocompatibles. Polisacáridos como el ácido algínico, carragenina, goma xantana y quitosano; proteínas como la caseína, zeína y β -lactoglobulina; son ejemplos de polímeros naturales usados para la síntesis de NPs.

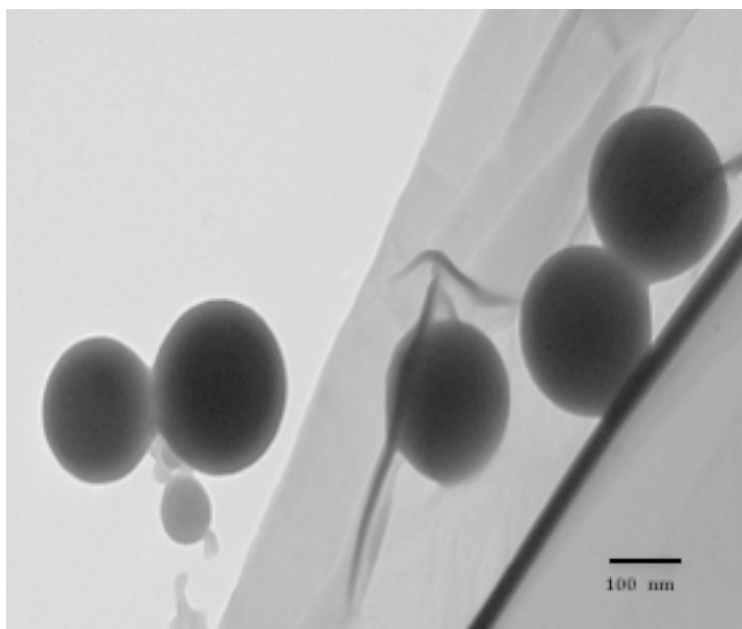


Figura. 7.12. Nanopartículas biopoliméricas de proteína α -lactalbúmina bovina. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La caracterización de las NPs y sus componentes estructurales –biomoléculas- en términos de tamaño, carga superficial, apariencia, distribución de encapsulados en la matriz, etc.; es crucial para el desarrollo y la aplicación tecnológica de estos sistemas.

Dentro de los parámetros fisicoquímicos más importantes a determinar en la caracterización de las NPs se encuentra el tamaño de partícula, éste tiene un impacto significativo en la estabilidad, consumo, deposición y la eventual eliminación del cuerpo. A pesar de la gran significancia de la investigación en el campo de la nanotecnología, solo algunos métodos pueden medir directamente el tamaño de partícula en una solución. Uno de los procedimientos usados más comúnmente para mediciones *in situ* de tamaño de partícula, está basado en la dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) o espectroscopía de correlación de fotones (PCS, por sus siglas en inglés). En esta técnica, la solución de NPs es iluminada por un láser. La luz del láser incidente es dispersada por las NPs, este fenómeno es captado por un detector cuyo ángulo de dispersión puede ser fijo o variable. Debido al movimiento Browniano de las NPs en solución, la intensidad de la luz dispersada fluctúa en función del tiempo (figura 7.13). Esta fluctuación de la intensidad de dispersión es una manifestación de la difusión de las NPs en la solución, lo que en efecto, está en función de su tamaño. Estas oscilaciones son capturadas muchas veces en un periodo corto (microsegundos) y analizadas utilizando una función de autocorrelación. El correlograma así generado, mide el decaimiento en la función de autocorrelación en función del tiempo y revela información referente al coeficiente de difusión traslacional (D) de la partícula en solución, a través de la ecuación (7.1). El coeficiente de difusión traslacional (D), está relacionado con el diámetro hidrodinámico de la partícula, por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$\tau = q^2 D \quad (7.1)$$

Donde:

τ es la tasa de decaimiento exponencial;
 q es el modulo del vector de dispersión;
 D es la difusión traslacional;

$$d = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (7.2)$$

Donde:

d es el diámetro hidrodinámico;
 k es la constante de Boltzman;
 T es la temperatura absoluta;
 η es la viscosidad (cizalla cero) absoluta del medio;

La técnica de DLS, es más precisa en la determinación del tamaño en muestras con una distribución estrecha. Además de la distribución de tamaño de partícula, la técnica de DLS puede proveer información valiosa con respecto a la estabilidad de las NPs, en respuesta a factores ambientales como: cambios en el pH, la temperatura, concentración de sal, presencia de enzimas, entre otros. Esta técnica se explicará más adelante en este capítulo.

Caracterización de biomoléculas

La caracterización de biomoléculas es de gran importancia para comprender su naturaleza así como su función; y por ende para el desarrollo de aplicaciones. Debido a ello, existen diversas técnicas analíticas que permiten caracterizar biomoléculas de manera sencilla. Dentro de éstas, la dispersión de luz basada en la fluctuación de un láser por el movimiento Browniano de las moléculas; es una de las más sencillas y comúnmente usadas, para determinar coeficientes de difusión y radios hidrodinámicos de moléculas en solución. Una manera de calcular el peso molecular de polímeros y proteínas es a partir del cambio en las propiedades coligativas de sus soluciones diluidas. Las cuatro propiedades coligativas son: i) descenso de la presión de vapor, ii) elevación ebulloscópica, iii) descenso crioscópico y iv) presión osmótica. A diferencia de las otras tres, la presión osmótica es la que muestra más cambios significativos, y por lo tanto es una de las más adecuadas para la caracterización de biomoléculas.

Otra manera de calcular el peso molecular de biomoléculas, es a través de electroforesis en gel, la cual es también una técnica de separación muy utilizada para la purificación de proteínas. Dentro de estos procedimientos, también se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución, que es a su vez una técnica cuantitativa, permitiendo así conocer la composición de mezclas complejas de proteínas. En las siguientes secciones de este capítulo, se describe brevemente el fundamento de cada una de estas técnicas analíticas. Finalmente, en la última sección se presentan problemas relacionados con la teoría de estas.

Movimiento browniano y dispersión de luz

Al movimiento aleatorio descrito por una partícula en un líquido en equilibrio térmico se le denomina movimiento Browniano. Este es irregular y continuo, de tal modo que describe una trayectoria de tipo zigzagueante. Este fenómeno fue estudiado por primera vez por el botánico Robert Brown en 1827; al observar el movimiento de granos de polen dispersos en agua a través de un microscopio, sentando así las bases de la cinética molecu-

lar. Utilizando polen que había sido almacenado por mucho tiempo (“polen muerto”), fue que Brown pudo comprobar que el movimiento aleatorio no era debido a un fenómeno de “vida” sino más bien a un proceso físico. Las moléculas o átomos de los líquidos y gases se encuentran en continuo movimiento, de tal modo que el polen se mueve aleatoriamente gracias al choque o colisiones con las moléculas de agua. Posteriormente, Einstein demostró que, gracias al movimiento Browniano se pueden encontrar las masas de átomos y moléculas (Einstein, 1905).

La técnica de dispersión de luz, para caracterizar biomoléculas disgregadas o disueltas en un líquido, es no invasiva, y se basa en el hecho de que el movimiento Browniano de las moléculas en suspensión ocasiona que la luz de un láser se disperse con diferentes intensidades. La caracterización se puede hacer para biomoléculas de un amplio rango de tamaños, desde el orden nano hasta micrómetros, también permite determinar la distribución de tamaños y la agregación de biomoléculas. La medición de la dispersión de la luz puede realizarse en dos modos: estático y dinámico.

La medición de la dispersión estática se basa en determinar el promedio de la intensidad de luz dispersada en cierto tiempo. Con esta técnica es posible encontrar el peso molecular y el valor cuadrático medio del radio de giro de la partícula. La variación en el ángulo de dispersión de la luz está relacionada con el tamaño de la molécula. La medición de la dispersión estática de luz está basada en el fenómeno conocido como efecto Tyndall. Este se observa cuando, partículas con tamaño cercano a la longitud de onda de la luz que se encuentran en un líquido, la dispersan a ciertos ángulos. La dispersión angular de la luz depende de la concentración de las partículas y de su interacción con el líquido.

Por otro lado, la dispersión dinámica de luz mide la fluctuación de la intensidad de esta, dispersada en cierto tiempo. El coeficiente de difusión trasnacional, el radio hidrodinámico y la distribución de tamaño de partículas pueden encontrarse con esta técnica (Cuadros, Pimentel et al, 2014). El concepto de radio hidrodinámico surge del hecho de que se adhiere una capa dipolar a una partícula en dispersión; es decir, la partícula se encuentra hidratada o solvatada siendo entonces mayor la medición de su diámetro. En la determinación de pesos moleculares absolutos por cromatografía por exclusión por tamaño, suele utilizarse un detector de dispersión dinámica de luz (figura 7.13).

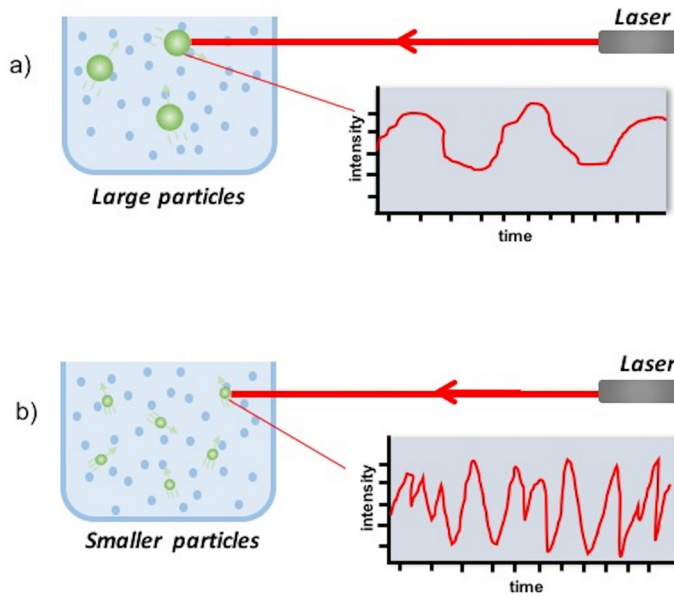


Figura 7.13. Técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Dos ejemplos de dispersión de luz por partículas según sus tamaños relativos: a) partículas más grandes; b) partículas más pequeñas.

Difusión y ósmosis

La difusión simple, consiste en el movimiento de moléculas de un soluto a través de una membrana permeable sin uso de energía.

Para moléculas neutras, la difusión puede definirse a través de la denominada Primera Ley de Fick (ecuación 7.3) (Blaustein, Kao et al, 2011).

$$J = -D \frac{\Delta C}{\Delta x} \quad (7.3)$$

La cantidad de materia que atraviesa un área de sección transversal (en este caso la membrana), en un determinado tiempo es conocida como flujo, mientras que el coeficiente de difusión es un valor específico para el soluto y el medio en el que se disuelve; se indica como negativo debido a que la dirección del proceso de difusión se da de manera pasiva, de una zona de mayor a una de menor concentración. Para procesos que no siguen cambios lineales de concentración, la ecuación anterior puede expresarse como (ecuación 7.4):

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (7.4)$$

Escribiendo la derivada en forma discreta,

$$J = -D \frac{\Delta C}{\Delta x} = -D \frac{C_i - C_e}{\Delta x} \quad (7.5)$$

Donde, $C_i - C_e$, es la diferencia entre la concentración al interior y al exterior.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que; la solubilidad del soluto en la membrana puede ser diferente a su solubilidad en la solución acuosa al interior de la célula, por lo tanto, las concentraciones en la membrana (C_m) y en la solución acuosa (C_s) pueden ser diferentes. Esto deriva en la necesidad de definir un coeficiente de partición (β), o cociente entre la concentración del soluto en la membrana y su concentración en la solución acuosa.

$$\beta = \frac{C_m}{C_s} \quad (7.6)$$

Donde:

C_m concentración en membrana;

C_s concentración en la solución acuosa;

Para el cálculo de las concentraciones en cada lado de la membrana tenemos:

$$C_{im} = \beta \cdot C_i \quad (7.8)$$

$$C_{em} = \beta \cdot C_e \quad (7.9)$$

Donde:

C_{im} es la concentración interior de la membrana;

C_{em} es la concentración exterior de la membrana;

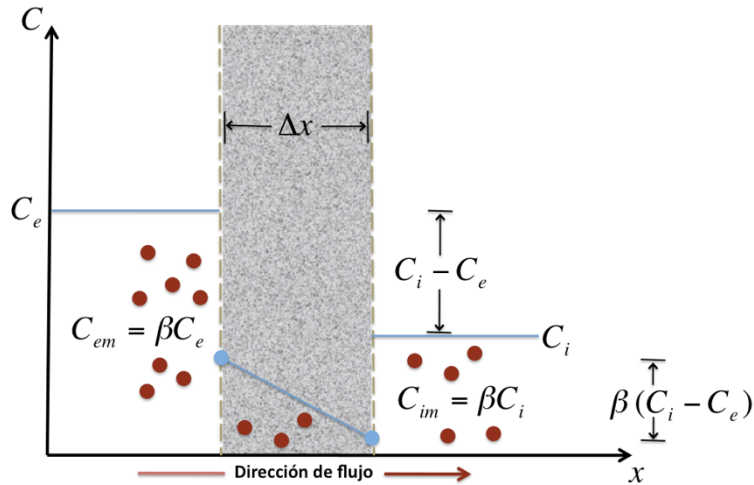


Figura 7.14. Esquema de un caso de difusión simple a través de una membrana semipermeable.

Definiendo el flujo a través de la membrana se tiene que:

$$J = -D \left[\frac{\Delta C}{\Delta x} \right] = -D \frac{C_{im} - C_{em}}{\Delta x} = -D \cdot \beta \cdot \frac{C_i - C_e}{\Delta x} \quad (7.10)$$

Finalmente, se puede definir al término $-D \cdot \beta / \Delta x$ como la permeabilidad de membrana :

$$P = -\frac{D \cdot \beta}{\Delta x} \quad (7.11)$$

En la célula, la difusión es una forma de transporte pasivo donde el movimiento de moléculas a través de la membrana se da en la dirección de mayor a menor concentración. En el cuerpo humano, la difusión lleva a cabo el intercambio de gases en los alveolos pulmonares, transportando oxígeno del aire a la sangre y CO_2 de esta al medio. Moléculas pequeñas como N_2 , O_2 , CO_2 , agua (18 g/mol), urea (60.06 g/mol) y glicerol (92.09 g/mol) son transportadas de manera pasiva. Mientras que otras más grandes y polares como la glucosa (180.15 g/mol) y los iones H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^+ , K^+ , Mg^{2+} requieren de difusión facilitada. En las plantas, la difusión se observa durante la fotosíntesis, en donde se intercambia CO_2 del aire a la hoja de la planta, y oxígeno de la hoja al aire.

La ósmosis, es un caso especial de la difusión y consiste en el movimiento de solvente desde una solución más diluida (en general, agua) a una de mayor concentración. Explicado desde el punto de vista de la fisicoquímica, durante la ósmosis, el agua fluye de regiones de alto potencial químico (medida de la tendencia al cambio) a regiones de bajo potencial químico.

La ósmosis se observa claramente en procesos con membranas. Si se considera un contenedor dividido en dos regiones por una membrana semipermeable al agua (es decir, que solo permite el paso esta), y si una parte contiene agua pura o una disolución acuosa no concentrada, mientras que la otra tiene una solución de un soluto; habrá movimiento de las moléculas de agua o de la disolución diluida hacia la solución más concentrada. Este fenómeno, fue observado por primera vez por Jean Antoine Nollet; quien puso un poco de vino en una vejiga de un animal. Después la colocó en agua y pasado un tiempo, la vejiga (que actuó como una membrana semipermeable) estalló al permitir solo el paso de las moléculas de agua, diluyendo el vino. El paso del soluto fue limitado por la membrana, de tal modo que con el agua que ingresó a la vejiga, el volumen original aumentó provocando la explosión de esta.

A la fuerza capaz de provocar el movimiento de agua a través de una membrana semipermeable con dirección hacia una disolución más concentrada, se le conoce como presión osmótica. Esta es directamente proporcional a la concentración de soluto y a la temperatura a la que se encuentra la disolución (Morris, Guerrero et al, 1982).

$$\pi = \alpha \cdot \frac{n}{V} \cdot T \quad (7.12)$$

Donde:

π presión osmótica (Pa)
 n número de moles (mol)
 V volumen (m^3)
 T temperatura (K)

Para estudiar la presión osmótica de un soluto en una disolución diluida, se podría asumir que la presión que el soluto ejercería sería aquella tal como si se comportara como un gas ideal a un determinado volumen, y a una temperatura dada. De este modo se puede introducir a la constante de los gases ideales en la ecuación (7.12) para quedar como:

$$\pi = R \frac{n}{V} T \quad (7.13)$$

La ecuación anterior fue descrita por Vant Hoff, y con ella es posible calcular la presión osmótica de una disolución diluida que se comporta de manera ideal.

Reordenado la ecuación (7.13), dado que

$$n = \frac{m}{M} \quad (7.14)$$

Donde:

m masa (g);

M peso molecular (g/mol^{-1});

$$\pi = R \frac{\frac{m}{M}}{V} T \quad (7.15)$$

Y tomando a $\frac{m}{V}$ como una concentración C , la ecuación (7.15) queda:

$$\pi = \frac{R \cdot C \cdot T}{M} \quad (7.16)$$

Cuando la presión osmótica se conoce, se puede entonces calcular el peso molecular del soluto.

$$M = \frac{R \cdot C \cdot T}{\pi} \quad (7.17)$$

La ecuación (7.17), puede aplicarse para calcular el peso molecular de solutos monodispersos, pero en el caso de biomoléculas y polímeros, se puede tener una distribución de pesos moleculares dada por cadenas de diferentes tamaños en una misma muestra, por lo que para estas sustancias se habla entonces de un peso molecular promedio.

La presión osmótica será máxima, cuando la membrana sea completamente impermeable al soluto y solo permita el paso de moléculas de agua. Mientras que si el solvente (generalmente agua), pasara libremente por la membrana no habría una presión osmótica y este caso se consideraría como un proceso de difusión simple, del cual se habló anteriormente. Sin embargo, en situaciones más reales, la membrana no es completamente impermeable al soluto y la presión osmótica sería menor al valor calculado con la ecuación (7.16). Debido a ello, se debe considerar una corrección utilizando un coeficiente de reflexión del soluto:

$$\sigma = 1 - \frac{P_{\text{soluto}}}{P_{\text{agua}}} \quad (7.18)$$

Donde:

σ coeficiente de reflexión;

P_{soluto} permeabilidad del soluto;

P_{agua} permeabilidad del agua;

El coeficiente de reflexión, es una medida de la cantidad de moléculas que chocan con la membrana, pero que no la atraviesan; y son entonces regresadas o “reflejadas” hacia el seno del compartimento.

Electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La electroforesis en gel es una técnica analítica de separación de proteínas, la cual se basa en la movilidad de éstas a través de una matriz cuando son sujetas a un campo eléctrico (figura 7.18). Si una proteína se encuentra en un medio con pH diferente al de su punto isoeléctrico, ésta presenta una carga neta y es justo esta propiedad la que se utiliza para la separación y caracterización de mezclas complejas de proteínas. El movimiento de la proteína depende de su relación carga/masa de tal modo que mientras mayor sea la carga por unidad de masa, mayor será el movimiento.

Dentro de las variantes de la electroforesis, la que se realiza en gel de acrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés; Polyacrylamide Gel Electrophoresis), es bastante utilizada para separaciones electroforéticas de proteínas. En esta técnica, el movimiento de la proteína no solo depende de su carga sino también del tamaño y su forma. Al preparar el gel de acrilamida, se pueden controlar su porosidad, y su transparencia e inocuidad representan una gran ventaja para la separación. El gel se prepara polimerizando al monómero acrilamida junto con N, N'-metilen-bis-acrilamida (que actúa como un agente entrecruzante), usando como iniciador de la reacción de polimerización a la tetrametilendiamina (TEMED), junto con persulfato de amonio. La bis-acrilamida ayuda a formar una red polimérica de porosidad uniforme la cual puede controlarse con las condiciones de reacción y la concentración de monómeros (Lomonte, 2007).

Las proteínas pueden separarse en estado nativo o desnaturizadas (sin estructura tridimensional). La técnica de PAGE se suele realizar en condiciones desnaturizantes, utilizando el tensoactivo dodecilsulfato de sodio (SDS) como agente desnaturizante, de tal modo que a diferencia de la electroforesis nativa, la separación depende únicamente de la carga y el tamaño pero no de la forma de la proteína. Una molécula de SDS se une por cada dos aminoácidos de la proteína formando un complejo SDS-proteína en una relación de aproximadamente 1.4 g de SDS por g de proteína; confiriéndole una carga negativa y ocasionando que la proteína migre hacia el ánodo de la cámara en donde se lleva a cabo la separación.

La electroforesis no solo es útil para la separación, también se usa para determinación de pesos moleculares, cuando se tiene un estándar de proteínas con estos datos ya conocidos, comparando la migración de la proteína a analizar con la del estándar.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography), es una de las más utilizadas para la separación de proteínas, péptidos y oligonucleótidos. Gracias a que esta técnica utiliza partículas muy pequeñas (en el orden de 3 a 10 micra) en el empaque de las columnas, es que su eficiencia en la resolución (capacidad de la columna para separar dos solutos.) es buena. Para separar moléculas polares, se utiliza esta técnica en fase normal, lo que quiere decir que la fase móvil (eluyente o disolvente) es poco polar, mientras que la fase estacionaria (matriz porosa insoluble; es decir, el material dentro de la columna de separación) es altamente polar. La técnica en fase reversa es aquella en la que la fase móvil es polar, y la fase estacionaria es no polar y es utilizada para muestras alifáticas o de carácter aromático.

La elución puede llevarse a cabo de manera isocrática o en gradiente. Para mezclas no complejas la elución isocrática en donde se mantiene la composición de la fase móvil a lo largo de toda la separación es adecuada. Sin embargo, para mezclas complejas de proteínas con tiempos de retención muy parecidos y de pesos moleculares mayores a 1 000 Da, se requiere realizar un gradiente de elución durante el cual se va utilizar más de un solvente, y se va cambiando la composición de la fase móvil durante el análisis.

Además de lograr la separación, la cromatografía en fase reversa ayuda a obtener información cuantitativa de las proteínas separadas, comparando el área bajo el pico del cromatograma con el área de uno o más estándares. Para cuantificar, se utilizan la normalización de área, la calibración con un estándar; ya sea interno o externo o la adición del estandar.

La normalización por área, consiste en asignar un porcentaje a cada uno de los picos; el cual es parte del total de estos. Por otra parte, para el método de calibración con un estándar externo, se preparan diversas soluciones de concentración conocida con dicho patrón, se realiza la elución de las muestras y se construye un gráfico de “concentración vs. área”; con el cual se comparan las áreas bajo la curva de los estándares y de las muestras. El estándar interno, es un compuesto diferente a la molécula de interés, se agrega una cantidad establecida y fija a cada una de las muestras a analizar. La adición del estándar se utiliza para la determinación de trazas al añadir una cantidad conocida de este a una solución de concentración desconocida y restando de la cuantificación total la cantidad conocida (Esquivel, Leal et al, 2004).

Problema 7.1 Transporte pasivo en membranas

*Maribel Hernández Guerrero**

Introducción

Este problema presenta dos casos de estudio práctico-demostrativos, que ejemplifican, dos tipos de transporte pasivo en membranas (difusión y ósmosis). El problema está diseñado para resolverse en el aula, realizando actividades sencillas para desarrollar habilidades de: observación, pensamiento crítico, trabajo colaborativo y metacognición; a través de la dinámica **Predice, Observa y Explica** (POE), agregando una parte de **Relación de los fenómenos demostrativos con los sistemas biológicos** (POER). Se describe la difusión simple observada durante la preparación de una infusión de jamaica; y la ósmosis al usar una papa como membrana semipermeable. Se explican los fundamentos teóricos detrás de los tipos de transporte en membranas y se concluye con la importancia de éstos para los sistemas biológicos. El problema está diseñado para alumnos de licenciaturas afines con biología, ingeniería y biotecnología. En específico para la licenciatura en ingeniería biológica, el problema puede presentarse a los alumnos del segundo trimestre en la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) de Introducción a la Ingeniería Biológica, en el tercer trimestre en la UEA Sistemas Biológicos, en la UEA de Técnicas Instrumentales Modernas del sexto trimestre y en la UEA de Biofísica del séptimo trimestre.

Objetivo: Que al resolver el problema el alumno sea capaz de:

- Diferenciar dos casos de transporte pasivo en membranas; en específico difusión y ósmosis y su importancia en la caracterización de biomoléculas.

Objetivos específicos: Que al solucionar el problema, el alumno sea capaz de:

- Comprender el concepto de transporte pasivo en membranas.
- Comprender la diferencia entre dos tipos de transporte pasivo en membranas (difusión y ósmosis).
- Relacionar los dos tipos de transporte pasivo a membranas biológicas.
- Comprender la importancia de los procesos de difusión y ósmosis en los sistemas biológicos.

* Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: mhernandez@correo.cua.uam.mx

- Comprender la importancia de los procesos de difusión y ósmosis para la caracterización de biomoléculas.

Planteamiento del problema

Recomendaciones: Lee las instrucciones proporcionadas antes de empezar la actividad. Si hay algo en la redacción que no se entienda pregúntalo hasta tener los enunciados perfectamente claros. Una vez que estos hayan sido comprendidos perfectamente, así como las preguntas; procede a la realización de la actividad y solución de los casos conforme a las indicaciones.

Caso 1. Estudio de la difusión simple en la preparación de una infusión de jamaica en agua

Material:

- 3 a 4 vasos de precipitados con agua
- 4 bolsitas para infusión con hojas de jamaica
- Parrilla de agitación y calentamiento
- 1 barra de agitación de teflón
- 1 termómetro
- 1 cronómetro
- 1 hoja o cartulina de color blanco

Instrucciones:

Prepara una infusión de jamaica con el material proporcionado. Utiliza la hoja o cartulina de color blanco como fondo para poder realizar observaciones con mayor facilidad.

Predice

¿Qué crees que sucederá al introducir la bolsa de té en el vaso con agua?

Observa

¿Qué sucede?

Explica

¿A qué se debe lo observado?

Relaciona

¿Cómo se relaciona lo observado y explicado con un sistema biológico?

Caso 2. Ósmosis

Alejandra empezó a entrenarse como asistente de cocina en un restaurante de la ciudad. Durante su instrucción, se le enseñaría a preparar papas horneadas rellenas de carne. Como tarea para su casa, el chef le pidió pelar una papa, partirla en dos y hacer una cavidad en el centro de cada mitad. Para mantenerlas frescas, le indicó que debía ponerlas en un plato con un poco de agua en el fondo hasta el siguiente día. El día de la clase, Alejandra se alistaba para ir al restaurante cuando notó algo extraño en la cocina, su hijo había estado jugando con la sal la cual estaba regada por todos lados. Mayor fue su sorpresa al ver, una de sus mitades de papas con un líquido salado en el interior de la cavidad y la otra completamente vacía.

Material:

- Una papa grande
- Sal
- Agua
- Pelador de papas
- Cuchillo
- Contenedor (para 2 mitades de papa)
- Sacabolas o cuchara parisina (opcional)

Instrucciones

Pela la papa y pártela en dos partes iguales. Con el cuchillo o la cuchara parisina, crea una cavidad en cada mitad cuidando de no atravesar y perforar la papa. El espesor de la pared interior debe ser de unos 2 a 5 mm. Coloca las mitades en el contenedor. Agrega un poco de sal a la cavidad de una. Añade agua al recipiente (suficiente para tener un nivel de líquido que cubra la mitad de las papas sin llegar a la parte superior). Deja transcurrir de 3 a 4 horas.

Predice

Suponiendo que por accidente haya caído un poco de la sal en la cavidad de una de las mitades de papa, ¿cómo pudo el agua migrar hacia la cavidad?, ¿por qué Alejandra no encontró agua en la otra mitad de papa?

Observa

¿Qué sucedió?

Explica

¿A qué se debe lo observado?

Relaciona

¿Cómo se relaciona lo observado y explicado con un sistema biológico?

Desarrollo de la solución

Caso 1. Estudio de la difusión simple al preparar una infusión de jamaica en agua

Predice

¿Qué crees que sucederá al introducir la bolsa de té en el vaso con agua?

Al preparar la infusión de jamaica, se observará cómo algunas moléculas de la flor tiñen el agua de color rojo vino. Estas, son suficientemente pequeñas para atravesar el sobre que actúa como un símil de membrana semipermeable. Usando el cronómetro y la tonalidad color rojo vino del agua, se espera que al aplicar calor, así como agitación mecánica; la preparación de la infusión (la coloración del agua), se facilitará aún más aumentando su rapidez.

Observa

¿Qué sucede?

Al inicio se observa, a la flor de jamaica molida en el interior del sobre en forma de partículas heterogéneas color vino oscuro (figura 7.15). Al introducir el sobre al agua sucede la hidratación de la bolsa de té y de la jamaica. Al cabo de unos minutos, se observa cómo las moléculas de la jamaica que son solubles en agua le empiezan a dar a ésta última una coloración rojo vivo. Se logra distinguir la dirección de flujo de moléculas que componen a la jamaica, desde la bolsa hacia el agua. Se observa que: el sobre actúa como una especie de membrana semipermeable que sólo permite el paso a ciertas moléculas; las partículas más grandes (pedazos de hoja de jamaica) permanecen dentro. Después de unos minutos, la coloración de las hojas de jamaica en el sobre cambia a una tonalidad más clara y las hojas se hinchan por la hidratación. Sin agitación, las moléculas de la jamaica que tiñeron el agua, se asientan en el fondo del vaso observándose regiones heterogéneas. Después de un tiempo, el medio se vuelve homogéneo y toda el agua se torna rosada al principio y color vino después. Al aplicar calor y agitación el proceso se acelera logrando que el agua adquiera una tonalidad rosada desde los primeros segundos de iniciado el proceso.

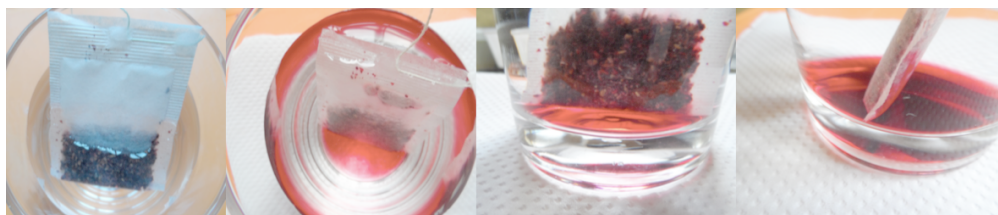


Figura 7.15. Difusión de los flavonoides de la jamaica en agua.

Explica

¿A qué se debe lo observado?

Las moléculas de agua comienzan a rodear las partículas de la flor de jamaica, hidratándolas y aumentando su volumen. Posteriormente, estas moléculas de agua disuelven algunas de las de la flor de jamaica (flavonoides), hasta llegar al punto en donde localmente (alrededor de las partículas de jamaica) la concentración de flavonoides es mayor que en el bulto del agua, dando lugar a un gradiente de concentración. La difusión de los flavonoides es causada por dicho gradiente y el movimiento aleatorio de las moléculas en el sistema. En la siguiente liga se puede observar una simulación de la trayectoria aleatoria de una molécula al difundirse en agua: <https://concord.org/stem-resources/diffusion-drop>

“La membrana semipermeable” (sobre que contiene la jamaica), sólo permite el paso de las moléculas de flavonoides, pero no de las partículas más grandes (pedazos de hoja de jamaica) que permanecen dentro del sobre. Los flavonoides se difunden hasta llegar a una concentración de equilibrio. La difusión de estos de la jamaica puede ser descrita por la ley de Fick. Al ser un modo de transporte basado en el movimiento de las moléculas, la difusión es dependiente del tiempo y la temperatura. El calor aplicado en la segunda parte de la actividad genera el movimiento de átomos y aumenta las vibraciones moleculares y su amplitud facilitando la difusión. Gracias a esta, después de cierto tiempo, las regiones heterogéneas que fueron formadas en el vaso al empezar el proceso se vuelven homogéneas. Tanto la temperatura como la agitación mecánica influyen en el movimiento de las moléculas y por lo tanto tienden a homogeneizar el medio de manera más rápida. La siguiente liga presenta un modelo en donde se observa el efecto de la masa molecular y la temperatura en el movimiento y difusión de moléculas <http://lab.concord.org/embeddable.html#interactives/sam/diffusion/3-mass.json>

Caso 2. Ósmosis

Predice

Suponiendo que por accidente haya caído un poco de la sal en la cavidad de una de las mitades de papa ¿cómo pudo el agua migrar hacia la cavidad?, ¿por qué Alejandra no encontró agua en la otra mitad de papa?

La capa delgada de papa actuará como membrana semipermeable permitiendo el paso del agua hacia las cavidades pero no de la sal hacia el agua. Sin embargo, como se menciona, el agua solo migró a la cavidad con sal por lo tanto, la fuerza impulsora para el transporte de agua debe ser una “concentración mayor de agua” en el recipiente, comparada con la papa hidratada y la sal al interior de la cavidad de una mitad de papa.

Observa

¿Qué sucedió?

Después de unas horas, se observó algo de oxidación en la papa, y el agua en el recipiente comenzó a migrar hacia la cavidad que tenía la sal, hasta llegar al punto de incluso disolverla. No se ve agua en la mitad que no contenía sal (figura 7.16).



Figura 7.16. Símil de ósmosis en una papa.

Explica

¿A qué se debe lo observado?

Se debe a la ósmosis. La capa del fondo de la cavidad de la papa actuó como membrana semipermeable y permitió el paso del agua desde el contenedor hasta la cavidad donde se encontraba la sal. La “membrana” de papa no permitió el paso de la sal hacia el agua.

Relaciona

¿Cómo se relaciona lo observado en los dos casos con un sistema biológico?

Según la definición de la IUPAC (por sus siglas en inglés; International Union of Pure & Applied Chemistry), las membranas son: “estructuras con dimensiones laterales mucho mayores a su espesor a través de las cuales puede existir una transferencia de masa bajo la acción de una o varias fuerzas”. Las células y sus compartimientos están limitados por estructuras llamadas membranas celulares o plasmáticas. Ambas, las células procariotas y eucariotas poseen membrana celular consistente en una estructura delgada (entre 7 y 9 nm), la cual es flexible, selectivamente permeable y constituye los límites de las células. De manera general, la membrana celular es considerada como una bicapa lipídica que actúa como una barrera hidrofóbica y de protección. Está compuesta de proteínas, lípidos y carbohidratos formando una especie de mosaico fluido. Aproximadamente, el 52% de la membrana son proteínas, mientras que el 40% son lípidos (55% fosfolípidos, 25% colesterol, 18% glucolípidos y 2% ácidos grasos), y el 8% de la composición general son carbohidratos. Su estructura es por lo tanto compleja y también asimétrica (su composición de lípidos y proteínas al interior es diferente a la exterior y la constitución varía de célula a célula). La membrana celular controla el intercambio de materia, regula la composición de los fluidos al interior de la célula a través del flujo continuo de sustancias neutras o

cargadas (nutrientes o desechos), manteniendo el equilibrio (homeostasis). La membrana ayuda a mantener una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la célula (Ashrafuzzaman & Tuszynski, 2012).

Tipos de transporte en membranas celulares

El intercambio de materia en la membrana se da a través de dos tipos principales de transporte: el pasivo y el activo (figura 7.17). El transporte pasivo; es el paso de moléculas a través de una membrana gracias al movimiento aleatorio y a una diferencia de concentración (gradiente de concentración). La difusión simple, es el caso más común de este. Otro ejemplo de transporte pasivo es la ósmosis. Mientras que el tercer tipo de transporte pasivo es la difusión facilitada, la cual requiere de un canal proteico o transportador para suceder.

A diferencia del transporte pasivo, el activo está definido como “la transferencia de un soluto a través de una membrana biológica con un gasto metabólico de energía” (Koros, Ma et al, 1996). Entonces se usan transportadores (proteínas), que utilizan la energía del ATP o los carbohidratos de la membrana para mover moléculas a través de esta, aun cuando la dirección de flujo no siga la del gradiente de concentración. En los organelos de la célula, se da el transporte de proteínas y adenosín trifosfato (ATP) (molécula indispensable para las funciones energéticas y del metabolismo celular).

En el cuerpo humano por ejemplo, el transporte de sustancias en la célula para mantener una concentración bioquímica óptima y constante es fundamental para la fisiología y el equilibrio (homeostasis). Debido a ello, los procesos de transporte en membranas son de gran importancia.

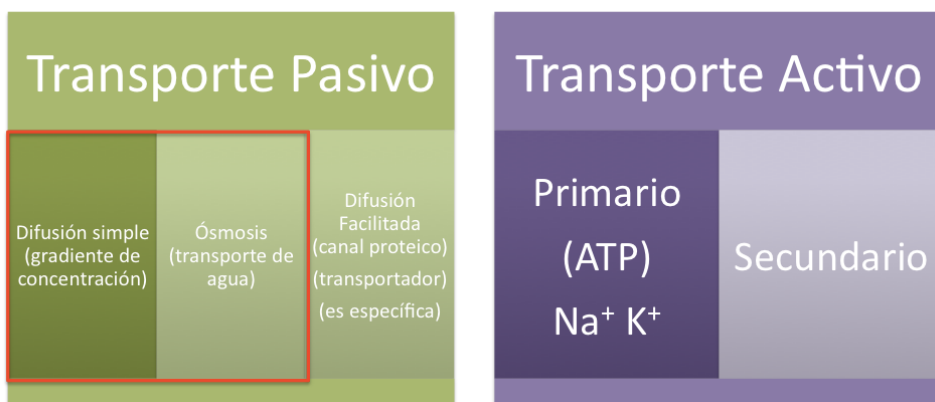


Figura 7.17. Tipos de transporte en la membrana celular.

La preparación de la infusión de jamaica, se asemeja al tipo de transporte pasivo de difusión simple.

Como se mencionó anteriormente, la difusión sucede gracias a un gradiente de concentración; es decir, una diferencia de concentración a lo largo de una distancia $\frac{\Delta C}{\Delta x}$, en donde la dirección de flujo se da gracias a movimientos aleatorios (movimiento Browniano) de las moléculas, desde la zona de mayor a la de menor concentración, sin otro requerimiento de energía y hasta que las concentraciones se igualan.

El fenómeno observado en el caso de las mitades de papa se debe al proceso de ósmosis. En un contenedor dividido en dos partes (A y B) por una membrana semipermeable al agua y no al soluto, el lado A contiene agua pura mientras que el B tiene una solución acuosa; habrá un flujo de agua desde A hacia B considerando que la concentración de esta es “mayor” en A, ya que la membrana semipermeable impide la migración del soluto hacia A. El desplazamiento de agua hacia B originará un aumento de volumen en esa sección del contenedor. A este flujo de agua se le conoce como ósmosis.

Para que el agua fluya a través de una membrana celular semipermeable selectiva, se requiere de una fuerza llamada presión osmótica. Dicha presión depende de la concentración del soluto y es importante en los sistemas biológicos para determinar las dimensiones y forma de las células. Dependiendo del medio circundante, en específico la concentración del soluto, las células pueden ganar o perder agua. Tomando como ejemplo a los eritrocitos (glóbulos rojos/células sanguíneas, encargadas del transporte de oxígeno y dióxido de carbono), si el soluto es permeable se tendrá un medio isotónico; es decir, en donde la concentración del soluto y agua son las mismas al interior y exterior de la célula (fluido extracelular, FEC) y donde no se observará cambio de volumen manteniendo en condiciones adecuadas a los eritrocitos. Por otra parte, cuando a las células están en equilibrio con el FEC y se agrega más soluto a este último, el FEC será hiperosmolar o hipertónico causando entonces la pérdida de agua de los eritrocitos. El tercer caso se da en FEC hipotónico donde la concentración exterior es menor y por lo tanto habrá migración de agua hacia el interior de la célula llegando incluso a romperse la membrana de estas células.

La concentración puede ser expresada en términos de osmolaridad (osmol/L) que está relacionada con la molaridad a través de la ecuación siguiente:

$$\text{osmolaridad} = i \cdot M \quad (7.19)$$

donde el factor de Van't Hoff (i) indica el grado de ionización del soluto.

Es así que, los dos casos representan a modelos sencillos del transporte pasivo en células.

Nomenclatura

J	flujo (mol/cm ²)/s
$-D$	Coeficiente de difusión cm ² /s
$\frac{\Delta C}{\Delta x}$	Gradiente de concentración lineal (mol/cm ³)/s
$\frac{dC}{dx}$	Gradiente de concentración no lineal (mol/cm ³)/s
i	Factor de Van 't Hoff, adimensional
M	Molaridad (mol/cm ³)
C_i	Concentración en el interior (mol/L)
C_e	Concentración en el exterior (mol/L)
Δx	Espesor de la membrana (m)
β	Coeficiente de partición, adimensional

Problema 7.2 Estrategia para: identificar una proteína extracelular de bajo peso molecular con actividad interfacial, producida por hongos filamentosos

Juan Gabriel Viguera Ramírez*

Introducción

Las hidrofobinas son pequeñas proteínas con actividad interfacial, sus secuencias tienen cerca de 120 aminoácidos, conteniendo ocho residuos de cisteínas que forman cuatro puentes disulfuro, los cuales le dan gran estabilidad a su estructura. Los autoensambles de las hidrofobinas clase I toleran lavados con detergentes (SDS 2%) a 100 °C, y solo pueden ser solubilizadas con ácido fórmico o trifluoroacético. Las hidrofobinas no han mostrado ser tóxicas para el ser humano, por lo cual son de gran interés para aplicaciones médicas y biotecnológicas; tales como la inmovilización de biomoléculas en superficies sólidas, biosensores y como surfactante en sistemas bifásicos sólido-líquido (Viguera, Shirai et al, 2008; Kupčík, Zelená et al, 2016).

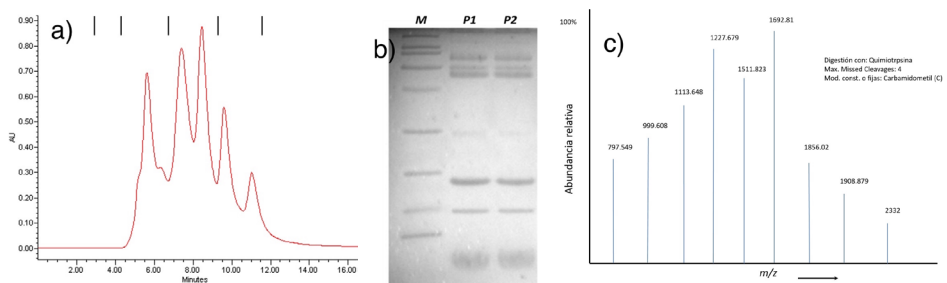
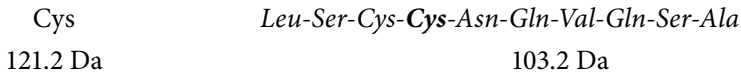


Figura 7.18. a) Cromatograma obtenido por HPLC. Muestra de proteínas (picos) extraídas de *S. commune*. Marcador (líneas arriba) mezcla de proteínas: γ -globulina (bovina); Ovalbumina (pollo); Mioglobina (caballo); Tiroglobulina (bovina); Vitamina B12. b) Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. Revelado con azul de Coomassie G-250. M, Marcador mezcla de proteínas: Albumina de suero (bovino);

* Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: jviguera@correo.cua.uam.mx

Aprotina (7kDa); anhidrasa carbónica; beta-galactosidasa; Fosforilasa b; Inhibidor de tripsina (22 kDa); Lisozima (huevo); Miosina; Ovalbumina (pollo). P1 y P2, Proteínas extraídas de *S. commune.c*). c) Espectro de masas monoisotópicas de los péptidos trípticos de la banda de 10.7 kDa obtenido por MALDI-TOF.

- i. Explique la diferencia en la masa molecular de la cisteína libre en comparación a cuando forma parte de un péptido.



R1: Cada enlace peptídico elimina una molécula de H₂O lo cual equivale a 18 Da.

- ii. ¿Cuál es la masa molecular promedio de los aminoácidos unidos en una cadena peptídica?

R2: La masa molecular promedio de un aminoácido unido en una cadena peptídica es 118.9 Da. Para estimar la masa molecular de una proteína se usa la relación 110 Da / aminoácido, la cual considera que algunos de estos se encuentran más frecuentemente que otros en las proteínas (figura 7.19).

Aminoácidos	Masa molecular (Da)
Isoleucina	131.2
Leucina	131.2
Lisina	146.2
Metionina	149.2
Fenilalanina	165.2
Treonina	119.1
Triptófano	204.2
Valina	117.1
Arginina	174.2
Histidina	155.2
Alanina	89.1
Asparagina	132.1
Aspartato	133.1
Cisteína	121.2
Glutamato	147.1
Glutamina	146.1
Glicina	75.1
Proline	115.1
Serina	105.1
Tirosina	181.2
Promedio	136.9

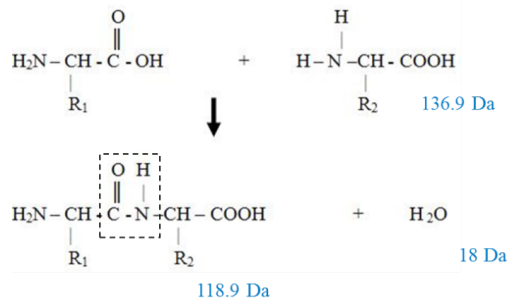


Figura 7.19. Masa molecular promedio de los aminoácidos.

- iii. Con base en a la información sobre el número de aminoácidos y contenido de cisteínas estime la masa molecular de las hidrofobinas.

$$\mathbf{R3:} \quad (8 \text{ Cys})(121.2 \text{ Da} - 18 \text{ Da}) \left(\frac{1 \text{ kDa}}{1000 \text{ Da}} \right) = 0.83 \text{ kDa}$$

$$112 \text{ a.a} \left(\frac{110 \text{ Da}}{1 \text{ a.a}} \right) \left(\frac{1 \text{ kDa}}{1000 \text{ Da}} \right) = 12.32 \text{ kDa}$$

Masa molecular hidrofobina = 13.15 kDa

- iv. Proponga dos metodologías para purificar la hidrofobina SC3 producida por el hongo *Schizophyllum commune* en un cultivo de estado sólido. Justifique su respuesta explicando el fundamento de su propuesta.

R4: Considerando las propiedades fisicoquímicas de las hidrofobinas y con base en lo reportado en la bibliografía, se propone realizar una extracción con ácido fórmico o ácido trifluoroacético, seguido por una precipitación en una columna de electroburbujeo, donde se aprovecha la capacidad que tienen las hidrofobinas para autoensamblarse en las interfaces (Vigueras, Shirai et al, 2008). Una segunda propuesta consiste en aprovechar la fuerte interacción que tienen las hidrofobinas con las superficies hidrofóbicas tal como el politetrafluoroetileno (PTFE), para lo cual se puede hacer una extracción de fase sólida con micropartículas de este material como proponen (Kupčík, Zelená et al, 2016).

- v. A partir de la imagen de un gel de electroforesis SDS-PAGE (condiciones desnaturalizantes), y un cromatograma de HPLC-SEC (condiciones nativas), se pide interpretar cada uno de los resultados; dando información sobre la masa molecular, pureza y diferencias encontradas entre los métodos.

R5: HPLC-SEC: Tiroglobulina (bovina) 670 kDa; γ -globulina (bovina) 158 kDa; Ovalbumina (pollo) 44 kDa; Mioglobina (caballo) 17 kDa; Vitamina B12 1.35 kDa.

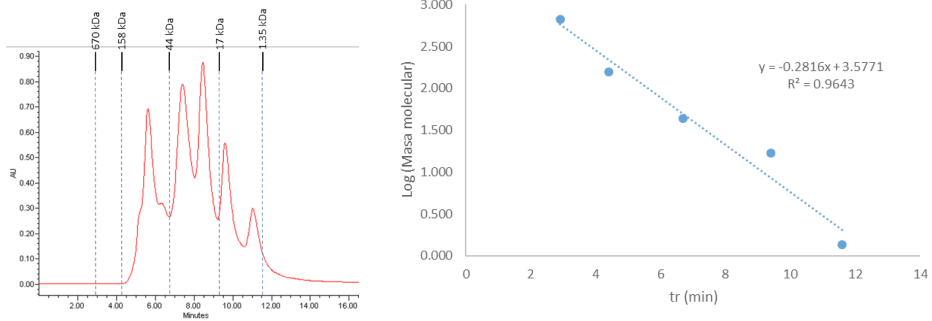


Figura 7.20. Obtención de la masa molecular promedio.

La masa molecular del pico 9.6 min se estima en 7.5 kDa de acuerdo a la curva estándar; hay que tomar en cuenta que la R^2 de 0.9643 es baja, visualmente en el cromatograma el pico está cercano a los 17 kDa (figura 7.20).

SDS-PAGE: Miosina, 200 kDa; beta-galactosidasa, 116 kDa; Fosforilasa b, 97 kDa; Albumina de suero (bovino), 66kDa; Ovalbumina (pollo), 45 kDa; Anhidrasa carbónica, 31 kDa; Inhibidor de tripsina, 22 kDa; Lisozima (huevo), 14 kDa; Aprotinina, 7 kDa.

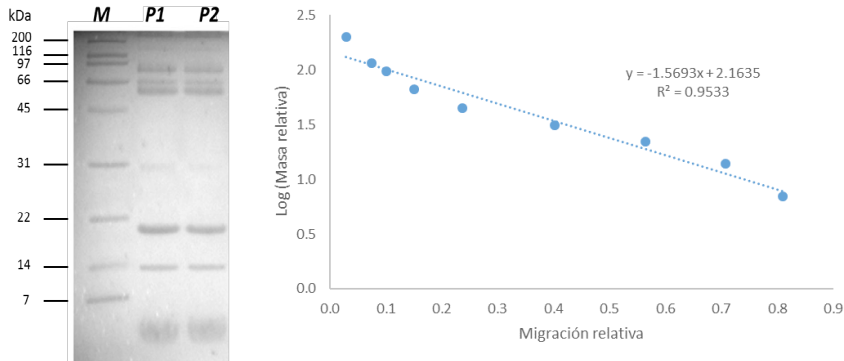


Figura 7.21. Obtención de la masa relativa.

En el gel también se puede observar una banda entre los 7 y 14 kDa, la cual, de acuerdo a la curva estándar se estima una masa molecular de 10.7 kDa, nuevamente se tiene una baja R^2 , visualmente la banda está cercana a los 14 kDa (figura 7.21).

En ambos métodos se observa que la muestra no está pura, en el HPLC se observan al menos seis picos y en el SDS-PAGE al menos nueve bandas detectadas.

- vi. Finalmente, se muestra un espectro de masas obtenido por MALDI-TOF de los péptidos producto de la digestión triptica de la proteína, con estos datos se pide usar la herramienta bioinformática Ms-Fit y Mascot Peptide Mass Fingerprint para obtener las secuencias de los péptidos y posteriormente hacer una búsqueda en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés) para encontrar homología con secuencias de proteínas reportadas (figura 7.22).

R6: Las siguientes masas monoisotópicas obtenidas del espectro de masas de los péptidos digeridos con tripsina, se usan para hacer la búsqueda de las secuencias de los péptidos, donde se consideran 4 cortes parciales o perdidos (Missed cleavages) y modificaciones fijas como carbamidometil en C (figura 7.22).

797.549
999.608
1 113.648
1 227.679
1 511.823
1 692.810
1 856.020
1 908.879
2 332.000

<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>

MS-Fit Search Results

[±] Parameters

[±] Pre Search Results (SwissProt.2016.9.6)

Fraction-Spot-Run ID: 1-1-1
MS-Fit search selects 34 entries (results displayed for top 5 matches).

[−] Results Summary

Protein Hit Number	MOWSE Score	# mat	% Cov	% TIC	Mean Err ppm	Data Tol ppm	# Hom Prot	MS-Digest Index #	Protein MW (Da)	pI	Accession #	Species	Protein Name
1	112	7/7/78	55.1	77.8	-0.0619	2.05	No	422786	13431/5.3		P16933	SCHCO	Fruiting body protein SC3
2	9.74	4/4/44	7.7	44.4	-2.64	34.3	No	494763	76462/5.1		Q49VV6	STAS1	UvrABC system protein B
3	4.72	4/4/44	12.9	44.4	4.18	7.88	No	339458	43894/7.2		Q5N0Y7	SYNP6	DNA replication and repair protein RecF
5	4.43	4/4/44	24.6	44.4	-8.41	19.1	No	32222	23066/5.1		P24826	ASCSU	ATP synthase subunit a

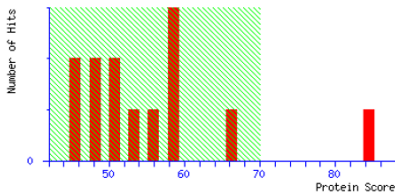
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : Gabriel
 Email : jvigueras@correo.cua.uam.mx
 Search title :
 Database : SwissProt 2016_08 (551987 sequences; 197275398 residues)
 Timestamp : 13 Sep 2016 at 06:58:37 GMT
 Warning : Specifying a protein mass disables mixture mode in PMF-search
 Top Score : 84 for [SC3_SCHCO](#), Fruiting body protein SC3 OS=Schizophyllum commune GN=SC3 PE=1 SV=2

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Preferred taxonomy

- [SC3_SCHCO](#) Mass: 13878 Score: 84 Expect: 0.002 Matches: 8
 Fruiting body protein SC3 OS=Schizophyllum commune GN=SC3 PE=1 SV=2

[PURQ_PROMT](#) Mass: 23946 Score: 60 Expect: 0.53 Matches: 7
 Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ OS=Prochlorococcus marinus (strain NATL2A) GN=purQ PE=3 SV=1

[ASSY_GLUOX](#) Mass: 45674 Score: 52 Expect: 3.9 Matches: 6
 Argininosuccinate synthase OS=Gluconobacter oxydans (strain 621H) GN=argG PE=3 SV=1

[PROB_AGRFC](#) Mass: 41044 Score: 51 Expect: 4.7 Matches: 6
 Glutamate 5-kinase OS=Agrobacterium fabrum (strain C58 / ATCC 33970) GN=prob PE=3 SV=1

[MIAA_RALPJ](#) Mass: 35330 Score: 50 Expect: 5 Matches: 6
 tRNA dimethylallyltransferase OS=Ralstonia pickettii (strain 12J) GN=miaA PE=3 SV=1

[WRKY54_ARATH](#) Mass: 39077 Score: 50 Expect: 5.5 Matches: 6
 Probable WRKY transcription factor 54 OS=Arabidopsis thaliana GN=WRKY54 PE=2 SV=2

[SPOA_CLOIN](#) Mass: 31955 Score: 50 Expect: 5.9 Matches: 6
 Stage 0 sporulation protein A homolog OS=Clostridium innocuum GN=spoA PE=3 SV=1

[RLHT_AERHH](#) Mass: 44733 Score: 48 Expect: 8.7 Matches: 6

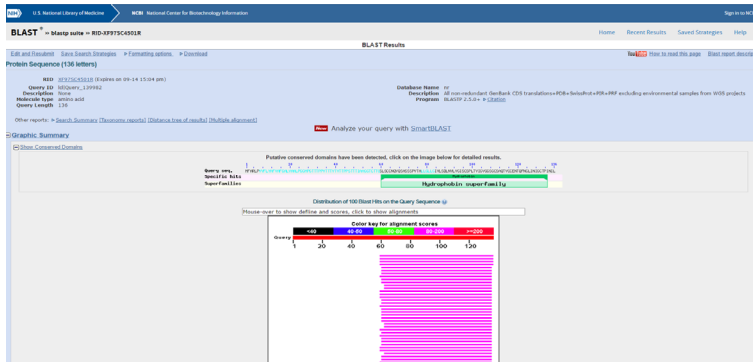


Figura 7.22. Captura de pantalla de los herramienta bioinformática Ms-Fit y Mascot Peptide Mass Fingerprint para obtener las secuencias de los péptidos.

Se encuentra homología con una proteína encontrada en los cuerpos fructíferos de *Schizophyllum commune* reportada como hidrofobina SC3. Identidad 100%; Puntaje de 257, Cobertura 100%; E-value $8e-87$. Además, la secuencia tiene un dominio conservado que corresponde a la superfamilia de hidrofobinas. Con lo cual se confirma que el extracto contiene una proteína hidrofobina SC3.

- vii. A partir de un gráfico de concentración de proteína con respecto a la disminución de la tensión interfacial, y toda la información sobre sus características bioquímicas, se pide proponer un par de aplicaciones para estas proteínas (figura 7.23).

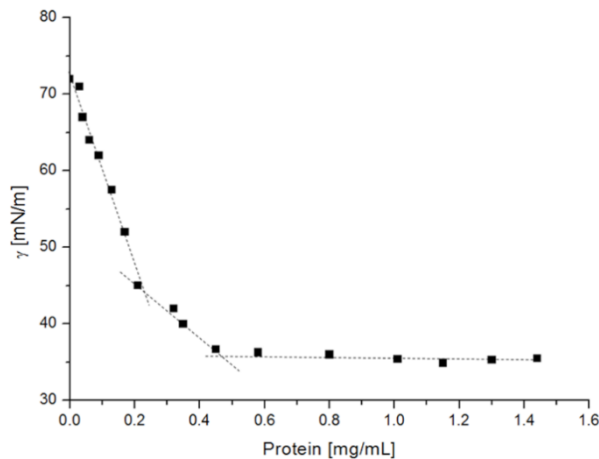


Figura 7.23. Concentración de proteína con respecto a la disminución de la tensión interfacial.

R7: En el gráfico (figura 7.23) se pueden observar tres zonas donde disminuye la tensión interfacial al incrementar la cantidad de proteína hidrofobina, alcanzando 35 mN/m con una concentración de 0.4 mg/mL.

Problema 7.3 Aplicación tecnológica de partículas biopoliméricas

Izlia Jazheel Arroyo Maya*

Planteamiento del problema

Uno de los avances más importantes en el campo de la nanotecnología en la industria farmacéutica y alimentaria, es la utilización de nanoestructuras como vehículos para la liberación de compuestos bioactivos (de interés biológico) dentro del organismo humano. Para lograr lo anterior, es necesario llevar a cabo la caracterización completa de este tipo de sistemas.

De los materiales de origen biológico que son adecuados para producir nanoestructuras, las proteínas resultan muy interesantes por sus características fisicoquímicas. Por ejemplo, la alfa-lactalbúmina, es una proteína globular presente en el suero de leche, que tiene la capacidad de formar nanopartículas bajo condiciones adecuadas de pH, concentración de proteína y fuerza iónica.

Supongamos, que se tiene una solución de nanopartículas cuyo diámetro hidrodinámico es de 205.1 nm y su peso molecular de 4.14×10^6 kDa.

a) ¿Qué estrategia usarías para determinar el número de moléculas de proteína presentes en cada nanopartícula?

Otra propiedad que permite la caracterización y un mejor entendimiento del ensamble en la proteína alfa-lactalbúmina en nanopartículas es la densidad de éstas.

b) ¿Cómo calcularías la densidad de estas nanoestructuras?

Se sabe que cada molécula de proteína tiene un peso molecular de 14 000 Da y sus dimensiones son: 2.5 x 3.7 x 3.2 nm. Se asume que las nanopartículas son esféricas y que no hay otros compuestos en la partícula.

* Departamento de Procesos y Tecnología UAM-Cuajimalpa, México. Correo electrónico: iarroyo@correo.cua.uam.mx

Respuesta

- a. Conociendo el peso molecular de las nanopartículas y el peso molecular de la proteína, se obtiene el número de moléculas ensambladas. Se considera que no hay otros componentes conformando la partícula:

$$\frac{4\ 140 \times 10^6\ Da}{14\ 000\ Da} = 297.7 \times 10^3\ moléculas$$

- b. Se tienen los siguientes datos:

- Diámetro hidrodinámico $d_h = 205.1\ nm$, a partir de aquí se obtiene el volumen de la partícula:

$$\frac{4}{3} \times \pi \times r^3 = 4.40 \times 10^{-15}\ cm^3$$

- Y conociendo la masa de la partícula:

$$masa = 4.14 \times 10^6\ kDa = 6.87 \times 10^{-15}\ g$$

- Se calcula la densidad:

$$\frac{6.87 \times 10^{-15}\ g}{4.40 \times 10^{-15}\ cm^3} = 1.54\ \frac{g}{cm^3} = densidad$$

Planteamiento del problema

Te encuentras realizando tus prácticas profesionales (*internship*) en una compañía que se dedica al diseño y desarrollo de materiales para la industria farmacéutica y de alimentos. Se te encomienda el desarrollo de acarreadores (encapsulantes) de compuestos bioactivos, las consideraciones para empezar con tu proyecto son las siguientes:

- Tienes dos tipos de compuestos nutraceuticos a encapsular, uno es de carácter Hidrofilico (soluble en agua), mientras que el otro es hidrófobo (soluble en grasa).
- Puedes utilizar los siguientes componentes (*building blocks*) para fabricar tus agentes encapsulantes: carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos.

Entonces, responde lo que se te pide:

- ¿Qué tipo de estrategia (*bottom-up*, *top-down*) podrías utilizar para diseñar tu material?
- ¿Qué tipo de material utilizarías para encapsular los dos tipos de compuestos y por qué?
- ¿Cómo elegirías el método de administración (tópica, intravenosa, oral)?
- ¿Cómo determinarías la capacidad de encapsulación de tu sistema?
- ¿Cuáles técnicas analíticas llevarías a cabo para caracterizar tu material y su estructura; y por qué?
- ¿En qué tipo de producto final incluirías el material desarrollado?

NOTA: Considera que de este desarrollo depende una buena contratación en una importante empresa.

Respuesta

En este ejercicio, el estudiante utilizará en concepto de desarrollo de nuevos productos, donde investigará y seguirá una metodología muy especializada; basada en procedimientos interdisciplinarios en los que intervienen áreas de: mercadotecnia, ventas, compras, manufactura e investigación y desarrollo.

La gran variedad de nuevos productos lanzados al mercado, si bien han sido desarrollados de manera muy particular basados en las políticas de cada compañía, todos tienen un común denominador para llevar a cabo su desarrollo, por ejemplo, la siguiente metodología se puede tomar como base para explicar los pasos que integran este proceso:

Formulación de la idea

- Generación de la idea: Tiene como objetivo recabar todas las posibles ideas para el producto, por ejemplo, se recomienda hacer una investigación sobre los diferentes métodos para obtener nanopartículas, así como la tecnología con la que se cuenta para este propósito (**inciso A, D y E**).
- Selección de la idea: El objetivo de este paso es; eliminar aquellas ideas que para las circunstancias de estrategias actuales de la empresa no pueden ser comercializadas (**incisos B, C y F**).
- Concepto del producto: Definir de la manera más clara y precisa el producto para desarrollar. En el caso de un alimento funcional se debe precisar clara-

mente este y considerar las características necesarias (atributos nutricionales, sabor, características organolépticas, condiciones de almacenamiento, vida de anaquel, objetivos y métodos de mercadotecnia) (**incisos B, C y F**).

- **Prueba de concepto:** Consiste en someter a prueba el concepto del nuevo producto con grupos de consumidores, para determinar si tiene atractivo para ellos y evaluar la aceptación del mismo (**incisos B, C, F**).

Plan

Una vez que se tiene definido el producto, se procede a realizar la planeación general para el desarrollo que incluye: Asignación del equipo del proyecto, desarrollo de la especificación verdadera del producto, realización del cronograma general del proyecto.

Desarrollo técnico y de la estrategia de mercadotecnia

Aquí se incluyen los siguientes procesos: Desarrollo de un prototipo, prueba en planta, análisis de precio, distribución comercial, publicidad.

Prueba de mercado

Es una prueba limitada en condiciones reales de venta, para probar la aceptación del producto por parte de los consumidores, la estrategia de mercadotecnia y ajustar los detalles de procesos de fabricación.

Comercialización

Consiste en la colocación del producto desarrollado en el mercado, al alcance de todos los consumidores potenciales. Un objetivo fundamental de esta etapa consiste en lograr, en el menor tiempo posible, un volumen de ventas suficiente para contar con los recursos necesarios para sostener la operación sin el apoyo financiero de la compañía, es decir, que el producto sea autofinanciable.

Bibliografía

- Ashrafuzzaman, M. & J. A. Tuszyński (2012). *Membrane Biophysics. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Ed. Springer Science & Business Media.
- Blaustein, M. P., J. P. Kao & D. R. Matteson (2011). *Cellular Physiology & Neurophysiology E-Book: Mosby Physiology Monograph Series*. Elsevier Health Sciences.
- Cuadros-Moreno, A., R. Pimentel, E. Martín-Martínez & J. Yañez (2014). *Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas*. Lat. Am. J. Phys. Educ. Vol 8(4): pp. 4314-4311.
- Einstein, A. (1905). "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen." *Annalen der Physik* 322(8): pp. 549-560.
- Esquivel Soto, E. E. & L. I. Leal Guadarrama (2004). *Métodos Físicoquímicos en Biotecnología*. México: Instituto de Biotecnología (UNAM).
- Koros, W., Y. Ma & T. Shimidzu (1996). *Terminology for membranes & membrane processes (IUPAC Recommendations 1996)*. *Pure & Applied Chemistry* 68(7): pp. 1479-1489.
- Kupčík, R., M. Zelená, P. Řehulka, Z. Bílková & L. Česlová (2016). *Selective isolation of hydrophobin SC3 by solid-phase extraction with polytetrafluoroethylene microparticles & subsequent mass spectrometric analysis*. *Journal of separation science* 39(4): pp. 717-724.
- Lomonte, B. (2007). *Electroforesis en gel de acrilamida. Manual de métodos inmunológicos*. Universidad de Costa Rica.
- Morris, J. G., R. Guerrero & F. Carretero (1982). *Físicoquímica para biólogos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología*. México, Reverté.
- Vigueras, G., K. Shirai, D. Martins, T. T. Franco, L. F. Fleuri & S. Revah (2008). *Toluene gas phase biofiltration by Paecilomyces lilacinus & isolation & identification of a hydrophobin protein produced thereof*. *Applied microbiology & biotechnology* 80(1): pp. 147.

Lecturas recomendadas

Hernández Millán, G. y López Villa, N. M.(2011). *Predecir, observar, explicar e indagar: estrategias efectivas en el aprendizaje de las ciencias*, Educació Química EduQ, 9, pp. 4-12.

Champagne, A. B., Klopfer, L. E., & Anderson, J. H. (1980). *Factors influencing the learning of classical mechanics*. *American Journal of Physics*, 48(12), pp. 1074-1079.

Gunstone, R.F. y White, R.T. (1981), Understanding of gravity. *Science Education*, 65, pp. 291–299.

IUPAC (1996) *Terminology for Membrane & Membrane Processes*.

Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004). *The Foundations of Biochemistry en Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ta Ed. W. H. Freeman, 2004, ISBN 10: 0716743396 New York. 1119 pp.

Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972), *The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes*. *Science*, 175 (4023), pp. 720–731.

McKee, J.R., McKee, T., McKee, G (2012). *Biochemistry: The Molecular Basis Of Life*, 3ra ed., McGraw-Hill.

Capítulo 8

Ingeniería metabólica

Guillermo Gosset Lagarda

Juan Carlos Sigala Alanís

Roberto Olivares Hernández

Introducción

El metabolismo de los seres vivos se compone de un conjunto de reacciones enzimáticas que involucran una gran diversidad de compuestos de interés para la industria química y biotecnológica. Se conectan y coordinan formando redes metabólicas y operan con el objetivo principal de sostener las funciones celulares. Para su estudio, el metabolismo celular se separa en dos procesos: el proceso catabólico y el proceso anabólico. De manera general una distinción entre ambos es el tipo de moléculas involucradas. En el proceso catabólico, s..se involucran moléculas de alto peso molecular que son oxidadas a moléculas mas pequeñas que funcionan a su vez como precursores para elaborar otras más complejas que posteriormente se utilizan en el anabolismo. En este último proceso se generan las macromoléculas que funcionan como componentes celulares, estas son, proteínas, carbohidratos, ADN, ARN, etc. El estudio del metabolismo tiene aplicaciones de carácter médico para abordar el problema de enfermedades como el cáncer o diabetes (DeBerardinis & Thompson, 2012). En el caso del desarrollo de aplicaciones industriales, el estudio del metabolismo tiene el objetivo de considerar a las células o microorganismos industriales como fábricas especializadas en la manufactura de productos químicos o biofármacos. Desde esta perspectiva se pueden producir químicos base para muchas industrias. Algunos de los ejemplos que ya se producen a escala industrial son: el ácido láctico para la producción de ácido poliláctico, el cual puede emplearse como un plástico biodegradable para empaques; polihidroxicanoatos para la producción de plásticos grado alimenticio, la producción de ácido succínico para alimentos, entre otros muchos que se están obteniendo y llevando a la industria (Erickson & Winters, 2012). Otros ejemplos de productos son proteínas y biofármacos, ejemplo, las enzimas como proteínas recombinantes como la insulina o moléculas como la penicilina (Ferrer, Domingo et al, 2009; Nielsen, 2013; Baeshen, Baeshen et al, 2014). Por la importancia de estos productos, el principal reto es: acceder a ellos de manera óptima; ya que en muchas ocasiones las productividades y

rendimientos de los productos químicos en estos sistemas biológicos no son viables económicamente para el desarrollo de procesos de producción. Se puede lograr a través de la modificación genética de organismos para incidir en su metabolismo con el fin de alcanzar los parámetros de productividad requeridos. En este aspecto, la ingeniería metabólica es una disciplina que posibilita la generación de estrategias para manipular las rutas metabólicas e incrementar la producción de químicos de interés y transformar células y microorganismos en fábricas celulares.

Desarrollo sustentable de productos y materias primas

En las actividades del hombre, el desarrollo de la biotecnología ha impactado en áreas como: la salud, alimentos, agricultura y medio ambiente, para lograr satisfacer la demanda de una población creciente. De igual manera la industria química ha tenido una participación importante, sobre todo aquella basada en productos del petróleo. Sin embargo, en la actualidad existe una preocupación creciente en relación al agotamiento de recursos no renovables como el petróleo, y los efectos del cambio climático asociados a su uso. Conscientes de la problemática, la comunidad científica está impulsando el manejo de materias primas renovables como: la biomasa vegetal proveniente de cultivos seleccionados o de desechos agroindustriales. Bajo este panorama, se han venido desarrollando propuestas con base biotecnológica para crear procesos de producción sustentables para la generación de combustibles, compuestos químicos y biomoléculas (proteínas terapéuticas, enzimas o plásmidos). Al conjuntar los objetivos de producción de la industria química con la biotecnología surge la biotecnología industrial. Este es un campo que se enfoca en la producción de compuestos químicos con el objetivo de sustituir los procesos de producción basados en el petróleo (Pandey, Höfer et al, 2015). Para poder lograrlo, el uso de microorganismos como fábricas celulares es una alternativa que ha demostrado tener un amplio potencial en la producción de químicos; así como ventajas en ámbitos económicos y ambientales. Un ejemplo ampliamente estudiado, que incluye las cuestiones económicas y ambientales: es el caso de la producción de etanol, el cual es usado como combustible y se produce con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a partir de fuentes de lignocelulosa (Soccol, Vandenberghe et al, 2010).

Los alcances de la biotecnología industrial no se limitan a la producción de químicos a granel como los combustibles o compuestos precursores para la producción de polímeros (Nakamura & Whited, 2003; Peralta, Zhang et al, 2012): también se incluye la elaboración de los denominados químicos finos o especializados, tales como terpenos (Tippmann, Chen et al, 2013) y policétidos (Leber, Aguirre et al, 2013) y proteínas recombinantes, como las enzimas celulasas y xilanasas para la hidrólisis de biomasa o biofármacos (Porro, Sauer et al, 2005; Martínez, Liu et al, 2012; Mattanovich, Branduardi et al, 2012). Aun-

que la producción de enzimas es parte de un mercado bien establecido, en un futuro se requerirá su fabricación en grandes volúmenes para poder aprovechar materias primas con contenido lignocelulósico. En los últimos años se favorece el consumo de los productos biodegradables, o que se elaboren por medio de procesos sustentables, estableciendo mercados selectos en donde se favorece su consumo. Por ejemplo, la producción biotecnológica de 1,3 propanodiol consume hasta un 38% menos energía y emite 42% menos gases de efecto invernadero, comparado con el proceso basado en derivados del petróleo. Aun cuando estos resultados son atractivos, el que no se logren introducir en mercados globales es un indicio de que aún existe una alta competitividad con los derivados petroquímicos (Nigam & Singh, 2011).

Además de tener fábricas celulares con capacidades productoras, es necesario que también se desarrolle la capacidad de consumir materias primas provenientes de fuentes renovables y con ello lograr disminuir los costos de producción, y el reto no es sencillo. Por ejemplo: actualmente la mayoría de los procesos de fermentación se basan principalmente en el consumo glucosa, la cual proviene de la hidrólisis del almidón de granos como el maíz, papa o de trigo. Pero es necesario aprovechar fuentes alternas como los desechos agroindustriales que contienen alto contenido de lignocelulosa. El metano y el dióxido de carbono es otro tipo de materias primas que se están considerando; principalmente por el impacto que tienen en el medio ambiente al ser liberados a la atmósfera. El aprovechamiento eficiente de estas materias primas podría incrementar la competitividad de los procesos de biotecnológicos (Chandel, Da Silva et al, 2013).

Debido a la gran variedad de compuestos químicos que usamos diariamente, se requiere de procesos sustentables que sean económicos para cubrir su demanda, logrando con ello el aprovechamiento de fuentes renovables; además de contender con los problemas ambientales que se enfrentan actualmente. La ingeniería metabólica del microorganismo, la tecnología de enzimas y la ingeniería de bioprocesos, se conjuntarán para generar complejos que involucren una diversidad de procesos de producción (Maity, 2015).

Ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica, es una de las disciplinas que posibilita la optimización del metabolismo, para lograr altos rendimientos y productividades de los compuestos de interés embebidos en las rutas metabólicas (metabolitos). Esta disciplina se basa en: la comprensión de las funciones del metabolismo celular, en la relación entre el genotipo y el fenotipo, en el uso de las tecnologías de fermentación, y en las herramientas de ingeniería genética y biología molecular (Stephanopoulos, Aristidou et al, 1998). Al conjuntar todos

estos conocimientos, la ingeniería metabólica tiene como objetivo la manipulación dirigida del metabolismo celular y su control para lograr incrementar variables críticas para la producción de metabolitos. Estas variables permiten una evaluación de las capacidades metabólicas, las cuales son:

- i. Productividad (mmol/gDWC/h): Este valor permite calcular la velocidad con la que se puede producir un metabolito y está normalizada por unidad de biomasa, permitiendo evaluar la eficiencia del microorganismo.
- ii. Título (g producto/L): Es un valor que nos indica cuánto producto se logra por unidad de volumen de la reacción (volumen del biorreactor, por ejemplo). Es un valor de relevancia para el diseño de los procesos de separación.
- iii. Rendimiento (g producto/g de sustrato): Nos indica la capacidad metabólica del microorganismo para aprovechar el sustrato en la generación del producto objetivo.

Con estas variables se puede medir la capacidad de un microorganismo productor, debido a que impactan de manera directa en el diseño y economía del bioproceso.

Un proyecto de ingeniería metabólica se inicia tomando en consideración la naturaleza del metabolito objetivo. Los escenarios que prevalecen son cuatro, donde cada uno puede conducir a estrategias distintas. En un primer escenario el metabolito objetivo se produce de forma endógena por los microorganismos. Un segundo escenario es cuando se desea producir el metabolito por medio de rutas metabólicas heterólogas. En este caso, se busca seleccionar un microorganismo que tenga ventajas fenotípicas sobre aquellos microorganismos que pueden producir el metabolito de forma endógena. El tercer escenario es cuando no se tiene registro de que la producción del metabolito tenga una base biológica, pero por medio de la inspección y construcción de nuevas vías metabólicas se puede sintetizar. Finalmente, en la cuarta opción, están los productos químicos que no tienen una base biológica y tampoco se tiene indicio de una ruta metabólica que pueda lograrlo. En este caso, se hace uso de la ingeniería de proteínas para generar enzimas sintéticas para poder llevar a cabo su síntesis. En la tabla 8.1, se describen los cuatro escenarios y se mencionan algunos ejemplos.

Tabla 8.1. La naturaleza del metabolito objetivo conduce a distintas estrategias de ingeniería metabólica. En esta tabla se presentan cuatro escenarios y algunos casos de estudio (Lee, Na *Et al.*, 2012).

Escenarios	Casos de estudio	Otros casos
Metabolitos que se producen en vías metabólicas endógenas.	El ácido láctico se produce de forma endógena por <i>Lactobacillus</i> spp. Para incrementar su síntesis se llevaron a cabo delecciones o sobreexpresión de genes.	ácido succínico L-valina putrescina
Metabolitos que se producen de forma heteróloga por medio de rutas metabólicas conocidas.	De un grupo de enzimas provenientes de otros microorganismos, se seleccionan las que mejor actividad tienen, llenando con éstas los pasos de reacción necesarios para la síntesis de un producto. Un ejemplo, es la producción de isobutanol en <i>Escherichia coli</i> que se logró por medio de introducir una descarboxilasa de <i>Lactobacillus lactis</i> y una deshidrogenasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	isopreno alcanos licopeno
Metabolitos que no se producen por una ruta metabólica conocida.	El estireno es un compuesto del cual no se tiene registro de que se produzca en algún microorganismo. Para lograr su elaboración se construyó una ruta metabólica sintética en <i>Escherichia coli</i> con genes provenientes de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	ácido adípico ácido aminocaproico 1,4 butanediol
Metabolitos que se producen por medio de enzimas sintéticas.	Al igual que en el caso del estireno, no se conoce de una vía metabólica que sintetice el ácido poliláctico (PLA). Para producirlo en <i>Escherichia coli</i> , primero se identificaron las enzimas que podrían usar el lactato como precursor. La propionato CoA transferencia de <i>Clostridium propionicum</i> ; y la polihidroxialcanoato sintasa de <i>Pseudomonas sp</i> MBEL 6-19: fueron las candidatas para llevar a cabo en ellas la ingeniería de proteínas para lograr producir el APL.	5-metil-1-heptanol L-homoalanina

Una vez que se tiene identificado el escenario en el que se encuentra el tipo de metabolito objetivo, se selecciona la estrategia de ingeniería metabólica, (tabla 8.2.) La implementación de estas estrategias de ingeniería metabólica puede generar efectos no deseados para la optimización del proceso. Por ejemplo: como resultado de una modificación de las rutas metabólicas puede haber una disminución en la tasa de crecimiento, generación de metabolitos alternos no deseados, e incluso la muerte de la fábrica celular. Para poder predecir estas situaciones, los modelos matemáticos del metabolismo se han utilizado como una herramienta auxiliar para explorar las capacidades metabólicas del microorganismo.

Tabla 8.2. La ingeniería metabólica se centra en la manipulación de las rutas metabólicas cubriendo principalmente cinco objetivos (Stephanopoulos et al 1998; Lee Et al., 2012).

Objetivo	Estrategia
Incrementar la productividad y el rendimiento de los metabolitos presentes en las rutas metabólicas.	Insertar genes heterólogos para que expresen las enzimas que catalizan las reacciones que conducen a la formación del metabolito objetivo. Suprimir genes para eliminar productos no deseados. Sobreexpresar enzimas para incrementar la actividad de las rutas metabólicas.
Proveer, o mejorar, la capacidad de los microorganismos para metabolizar distintos sustratos.	Modificar la capacidad de los microorganismos para consumir distintos sustratos expresando enzimas heterólogas. Las enzimas pueden ser transportadores específicos para los sustratos y las enzimas que los metabolizan. Por ejemplo, la xilosa no es metabolizada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , por lo que se han incluido las rutas necesarias en la producción de etanol.
Síntesis de metabolitos que no se encuentran de forma natural.	Aprovechando la capacidad de las enzimas para reconocer distintos sustratos, se construyen rutas que no existen naturalmente. Las enzimas son manipuladas por medio de ingeniería de enzimas para proveerles nuevas capacidades catalíticas.
Adaptación de fenotipos idóneos para condiciones de proceso.	Existen bacterias como <i>E. coli</i> diseñadas para la producción de isobutanol, pero que no tienen la misma capacidad de tolerar el estrés por altas concentraciones de alcohol; como las que naturalmente puede tener una levadura. Por medio de una adaptación evolutiva es posible que se desarrolle el fenotipo requerido. También la evolución metabólica ha permitido mejorar las capacidades de las cepas para lograr mayores productividades.
Degradación de químicos no biológicos.	Para llevar a cabo la degradación xenobiótica se incluyen rutas metabólicas para lograr la asimilación metabólica. En estos casos también se requiere de la ingeniería de los transportadores específicos para la molécula.

Problema 8.1 Generación de una cepa de *Escherichia coli* para la producción de L-tirosina

Guillermo Gosset Lagarda

Introducción

Los compuestos aromáticos son una clase de moléculas orgánicas que incluye una gran cantidad de productos con aplicaciones industriales. El aminoácido aromático L-tirosina (L-Tir) es un compuesto natural que tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, química y de alimentos (Chavez, Baez et al, 2012). El mercado total de este aminoácido asciende a aproximadamente 150 toneladas por año (Bongaerts, Kramer et al, 2001). Los métodos empleados comúnmente para la obtención de este compuesto; se basan en su extracción a partir de hidrolizados de proteína; también en la síntesis a partir de amonio, piruvato y fenol por la enzima L-Tir fenol liasa (Para, Lucciardi et al, 1985). La variabilidad en la composición de la materia prima y la dependencia de insumos provenientes del petróleo; son desventajas de estos métodos de obtención. Por esta razón, se han explorado estrategias alternas que permitan obtener a este aminoácido. La mayoría de las bacterias poseen la capacidad natural de sintetizar a la L-Tir, por lo tanto, potencialmente podrían emplearse como organismos productores de este aminoácido.

La mayoría de las bacterias y plantas poseen rutas metabólicas que les permiten convertir fuentes de carbono simples en diferentes compuestos aromáticos. La vía común de síntesis de estos, también conocida como la vía del ácido shikímico, es el tronco común a partir del cual se originan vías biosintéticas que dan origen a metabolitos esenciales. La síntesis de los compuestos aromáticos en la bacteria *Escherichia coli* se inicia con la condensación entre el fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa 4-fosfato (E4P); para formar el 3-desoxi-D-arabino-heptulosoato 7-fosfato (DAHP); en una reacción catalizada por las tres isoenzimas de DAHP sintasa (AroF, AroG y AroH) (figura 8.1). Después de seis reacciones enzimáticas, se produce el intermediario corismato (COR), a partir del cual se sintetizan los aminoácidos aromáticos L-Tir, L-fenilalanina (L-Fen) y L-triptófano (L-Trp). La enzima bifuncional corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa (CM-PDH), codificada por el gen *tyrA*, interviene en la etapa final de la biosíntesis de L-Tir. La reacción inicial involucra la conversión del COR en prefenato (PPA), por el dominio corismato mutasa (CM) de la enzima CM-PDH. El PPA es sustrato del dominio prefenato deshidrogenasa (PDH) de CM-PDH; el cual descarboxila y oxida a este compuesto para generar 4-hidroxifenilpiruvato (HPP). La conversión del HPP en L-Tir es catalizada por la enzima aminotransferasa de L-Tir, codificada por el gen *tyrB*.

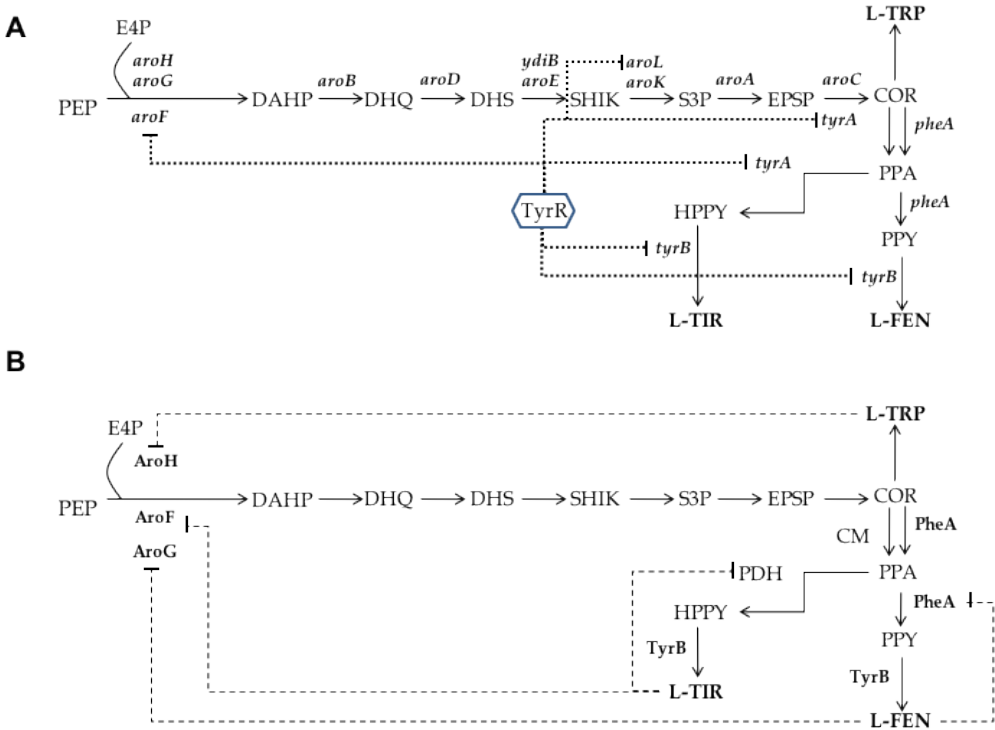


Figura 8.1. Regulación transcripcional (A) y de actividad enzimática (B) en las vías de síntesis de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*.

La síntesis de aminoácidos, en particular los aromáticos, es costosa para la célula, tanto en términos de átomos de carbono, como de energía en forma de ATP. Por esta razón, la vía biosintética común y las vías específicas se encuentran reguladas. Un nivel de control ocurre sobre el inicio de la transcripción de algunos genes. La proteína TyrR, es un regulador transcripcional que en presencia de uno o varios de los aminoácidos aromáticos, se une al ADN en la región promotora de genes, que codifican para enzimas de las vías de síntesis de compuestos aromáticos, evitando que éstos se transcriban (figura 8.1A). La represión ejercida por TyrR, cuando está presente en el medio externo la L-Tir u otro de los aminoácidos aromáticos, causa que no se sinteticen las enzimas de la vía biosintética para estos compuestos. Otro nivel de control ocurre sobre la actividad de las enzimas en las vías biosintéticas. Se ha determinado que la acción de las tres isoenzimas de DAHP sintasa (AroF, AroG y AroH) es inhibida en presencia de alguno de los tres aminoácidos aromáticos (figura 8.1B). Así mismo, la L-Tir inhibe la actividad de PDH de la enzima bifuncional CM-PDH (Bongaerts, Kramer et al, 2001).

Objetivo del problema

Como resultado de los mecanismos de regulación, mencionados anteriormente, se concluye que: en la naturaleza no es posible encontrar bacterias que sobreproducen L-Tir y la excreten al medio de cultivo. Por lo tanto, es necesario aplicar estrategias específicas de modificación genética para la generación de cepas de producción para L-Tir. Las herramientas de la ingeniería genética, aplicadas a la modificación de funciones relacionadas con el metabolismo y su regulación, constituyen la base de la ingeniería metabólica. Esta área de la biotecnología permite desarrollar cepas microbianas con la capacidad de producir diversos compuestos de interés. En este caso, el objetivo consiste en aplicar la ingeniería metabólica para redirigir la mayor parte de los átomos de carbono de la glucosa, hacia la vía específica de síntesis de L-Tir.

Metodología

La estrategia general para lograr el objetivo deseado se basa en eliminar los controles naturales que evitan la sobreproducción del aminoácido. El primer paso consiste en aumentar el flujo de carbono del metabolismo central hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos. Esta vía inicia con la condensación de PEP y E4P para formar DAHP, en una reacción catalizada por las isoenzimas de DAHP sintasa. Como se mencionó, este paso se encuentra regulado mediante inhibición de la actividad enzimática. Una forma de evitar este control consiste en: la generación de una versión mutante de la isoenzima AroF que no se inhiba por L-Tir. La caracterización bioquímica de esta enzima en *E. coli*, ha revelado que; algunos cambios en su secuencia, o la eliminación de algunos residuos de aminoácido en la región amino terminal, suprimen la inhibición de su actividad por la L-Tir [4]. La eliminación de los primeros siete residuos de aminoácido de la región amino terminal de AroF, genera una enzima activa; que no se inhibe por L-Tir, llamada 'AroF. Empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplifica la región del gen *aroF* que corresponde a AroF, a partir de ADN cromosomal de *E. coli*. La secuencia del cromosoma de *E. coli* que corresponde a *aroF* y regiones flanqueadoras; puede ser obtenida de alguna de las bases de datos disponibles en línea como: <http://www.genome.jp>. Se emplean como iniciadores para la reacción de PCR, a los oligonucleótidos (5P-GAC GCG CTG ACC ATG GTA CAT ATT ACC GAC-3P) para la región 5'; y (5P-GCG GTC AAT TCA GGA TCC ATA ATA AAC CTC-3P) para la región 3'.

Los oligonucleótidos incluyen los sitios de restricción *NcoI* & *BamHI*. La reacción de PCR debe generar un producto de 1 092 pares de bases (pb). El producto de PCR es digerido con las enzimas de restricción *NcoI* & *BamHI*, al igual que el plásmido de expresión pTrc99A (Amann, Ochs et al, 1988). Los productos de la digestión son purificados y sometidos

dos a una reacción de ligación empleando la ligasa del fago T4. La cepa *E. coli* W3110, u otra cepa adecuada para experimentos de clonación; es transformada con una alícuota de la mezcla de ligación. Las células transformantes son seleccionadas en medio que contenga ampicilina, ya que el plásmido pTrc99A posee un gene que confiere resistencia a este antibiótico. Mediante análisis del patrón con enzimas de restricción y la determinación de la secuencia nucleotídica del gene clonado se verifica la integridad de la construcción genética pTrc99A-*aroF*.

El plásmido pTrc99A fue diseñado para lograr un alto nivel de expresión de los genes clonados (Amann, Ochs et al, 1988). Actualmente existe una gran diversidad de plásmidos con esta función, cada uno de ellos posee características específicas que los hacen adecuados para diferentes tipos de aplicaciones biotecnológicas. El plásmido pTrc99A, contiene el promotor fuerte *trc* con un sitio de unión al ribosoma que permiten una alta tasa de transcripción y traducción de los genes clonados. El promotor *trc* es regulado por la proteína represora LacI. Es posible eliminar la actividad de este represor, y así inducir la expresión de los genes controlados por *trc* si se agrega al medio el compuesto isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El plásmido pTrc99A, se encuentra en aproximadamente 30 copias por célula. La combinación de un promotor fuerte y el efecto multicopia, permiten lograr un alto nivel de expresión de los genes clonados. Una ventaja adicional importante de utilizar un plásmido de expresión, es que se reemplaza el promotor nativo de un gene (el cual puede estar sujeto a algún tipo de regulación genética no deseado), por un promotor conocido que puede ser regulado fácilmente. En el caso del gene *aroF*, su expresión es reprimida por la proteína TyrR cuando existe L-Tir en el medio de cultivo (figura 8.1A). Por el contrario, la expresión del gene *aroF* dependiente del promotor *trc* puede ser controlada mediante la adición de IPTG al medio de cultivo y ya no se encuentra sujeto a represión dependiente de L-Tir.

El compuesto E4P es un intermediario de la vía de las pentosas fosfato, también uno de los precursores de los compuestos aromáticos. Se ha determinado que la sobreexpresión de la enzima transcetolasa, codificada por el gene *tktA*, tiene un efecto positivo en el flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos (Patnaik & Liao, 1994). Siguiendo el método descrito anteriormente para el gene *aroF*, se puede amplificar por PCR (a partir de ADN cromosomal de *E. coli*), al gene *tktA*. Debido a que el promotor de *tktA* no está sujeto a regulación transcripcional, es posible incrementar (también a partir de ADN cromosomal de *E. coli*), al gene junto con su promotor nativo y ligarlo a un plásmido multicopia (figura 8.2). En este caso, se elige ligar al producto de PCR que contiene al gene *tktA* y su promotor al plásmido pACYC184; para generar pACYC184-*tktA*. Es importante señalar que en *E. coli* existen familias de plásmidos, las cuales pueden mantenerse simultáneamente en una misma célula y de forma estable (Scheich, Kummel et al, 2007). Es así que es posible construir una cepa de *E. coli*, que posea simultáneamente a los plásmidos pTrc99A-*aroF* y pACYC184-*tktA*.

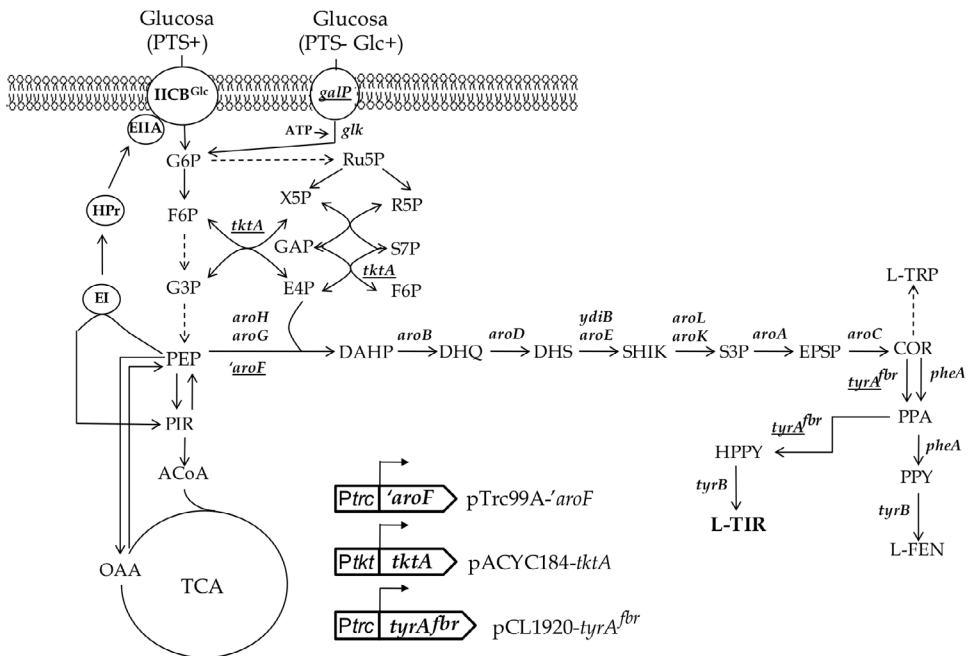


Figura 8.2. Metabolismo central y vías de síntesis de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*. Se indican los genes expresados a partir de plásmidos para aumentar flujo de carbono hacia la síntesis de L-tirosina.

Una cepa de *E. coli*, que sea transformada con los plásmidos: pTrc99A-*aroF* y pACYC184-*tktA* (*E. coli*/pTrc99A-*aroF*/pACYC184-*tktA*); mostrará un flujo mayor hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos, la cual termina con la producción de COR. Esto puede demostrarse con cultivos en matraz, empleando medio mínimo suplementado con 10 g/L de glucosa. Bajo estas condiciones, es posible detectar la acumulación del intermediario DAHP, el cual puede ser cuantificado por un método colorimétrico (Baez, Bolivar et al, 2001). El DAHP se acumula y es secretado al medio de cultivo, debido a que la enzima que lo consume, 3-dehidroquinato sintasa (*aroB*); no es capaz de contener con el alto flujo causado por la sobreexpresión de *aroF* y *tktA*.

La redirección del flujo de carbono de COR hacia L-Tir, depende de la expresión de una versión de la enzima CM-PDH que no sea inhibida por L-Tir. Se ha reportado la obtención de una versión mutante de la enzima CM-PDH de *E. coli* que no se inhibe por L-Tir. Esto se logró siguiendo un esquema de mutagénesis generalizada del gen *tyrA* por PCR; con la selección mediante resistencia a *m*-fluoro-D,L-tirosina; el cual es un análogo tóxico de la L-Tir. Este gen mutante, llamado *tyrA^{fbr}*, muestra 35% de la actividad de la versión silvestre de CM-PDH y no es inhibida por L-Tir (Lutke & Stephanopoulos, 2005). Se determinó la secuencia nucleotídica de *tyrA^{fbr}*, estableciéndose que: posee dos sustituciones en su secuen-

cia que corresponden en la proteína CM-PDH a metionina-53-isoleucina en el dominio de CM; y alanina-354-valina en el dominio de PDH (Lutke & Stephanopoulos, 2007). Con base en esta información, es posible emplear a alguno de los servicios comerciales que se especializan en síntesis de ADN (<http://www.genscript.com>), para solicitar que se elabore el gene *tyrA^{ibr}*. Como parte del proceso de síntesis; se puede incorporar la secuencia del promotor *trc* presente en pTrc99A a la cadena de *tyrA^{ibr}*; para así contar con una versión de este gene que se puede ligar a un plásmido y expresarse a partir de un promotor fuerte. En este caso, se puede emplear al plásmido pCL1920, para generar a pCL1920-*tyrA^{ibr}*. Este es compatible con los plásmidos pTrc99A y pACYC184; por lo tanto, se puede generar la cepa: *E. coli*/pTrc99A-*aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA^{ibr}*. Esta posee las modificaciones esenciales que resultarán en la secreción de L-Tir al medio de cultivo. Esto se puede verificar; efectuando cultivos en matraz con medio mínimo suplementado con glucosa 10 g/L y con IPTG 0.5 mM; para inducir a los genes controlados por el promotor *trc*. Los cultivos se efectúan a 37 °C. Se toman muestras cada dos horas durante 24 h, para cuantificar los niveles de L-Tir y glucosa, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La concentración celular se determina mediante espectrofotometría a 600 nm. Una descripción detallada del medio de cultivo y los métodos analíticos pueden ser encontrados en la publicación de Chávez-Béjar *et al.*, 2008 (Chavez-Bejar, Lara et al, 2008).

La cepa anterior puede ser modificada para incrementar su capacidad como productora de L-Tir a partir de glucosa. El intermediario glicolítico PEP, participa como donador de un grupo fosfato dentro del proceso de internalización de varios azúcares, en una reacción catalizada por el sistema de fosfotransferasa (PTS). El PTS es un sistema complejo presente en bacterias, está constituido por varias proteínas, cada una de ellas con funciones específicas. Las proteínas EI, HPr y EIIA; constituyen una cadena de fosforilación que termina en alguna de las proteínas IIB; las cuales participan en la fosforilación y transporte de varios azúcares, entre ellos la glucosa (figura 8.2). No obstante que PTS, es muy importante en la fisiología normal de *E. coli*; la dependencia sobre su utilización de PEP para transportar azúcares, constituye una desventaja para fines biotecnológicos. Al acoplar el transporte de glucosa al consumo de PEP, PTS limita la disponibilidad de este precursor para la síntesis de compuestos aromáticos (Gosset, 2005). Con el objetivo de obtener cepas de *E. coli* con alternativas al uso del sistema PTS, se han generado líneas con este sistema inactivado (PTS⁻): también otras derivadas de esta última que han adquirido la capacidad de transportar y fosforilar glucosa sin utilizar el PTS (PTS⁻ glucosa⁺) (Flores, Xiao et al, 1996; Flores, Gosset et al, 2002). Para este propósito y como parte de la caracterización fisiológica de estas cepas, se demostró que poseen el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos, con un rendimiento a partir de glucosa mayor que el de una cepa con un PTS funcional (PTS⁺) (Flores, Xiao et al, 1996; Gosset, YongXiao et al, 1996; Baez, Bolivar et al, 2001). Así mismo, se ha demostrado que en las cepas PTS⁻ glucosa⁺, el transporte de esta es dependiente de la proteína GalP y la fosforilación del azúcar es catalizada por la enzima glucocinasa, utilizando ATP como donador del grupo fosfato (Flores, Gosset et al, 2002) (figura 8.2).

Tomando en cuenta esta información, es posible seguir una estrategia de dos pasos para generar una cepa productora de L-Tir con el fenotipo PTS⁻ glucosa⁺. En primer lugar, es necesario construir una cepa que carezca de los genes que codifican para las proteínas EI, HPr y EIIA. Para este efecto, se puede utilizar a la colección Keio, la cual consiste en cepas mutantes en cada uno de los genes de *E. coli* (Baba, Ara et al, 2006). Siguiendo el método de transducción con el fago P1 *vir*, se transfieren de la colección Keio a la cepa de interés las mutaciones en los genes *pstI*, *ptsH* y *crr* que codifican para EI, HPr y EIIA, respectivamente (Hernandez, Martinez et al, 2003). La cepa resultante mostrará el fenotipo PTS⁻ glucosa; es decir, carece de la capacidad de consumir glucosa debido a la falta de funcionalidad de PTS. Para reconstituir la capacidad de consumo de glucosa, es necesario sobreexpresar al gene *galP* que codifica para el transportador alternativo de glucosa GalP. Esto se puede lograr siguiendo el método descrito por De Anda et al, 2016, que se basa en: el reemplazo del promotor nativo de *galP* en el cromosoma, por el promotor fuerte *trc* (De Anda, Lara et al, 2006). Se ha demostrado que con tal modificación, se recupera aproximadamente en un 80% la capacidad de consumo de glucosa en una cepa PTS⁻, lo cual corresponde al fenotipo PTS⁻ glucosa⁺. Alternativamente, el gene *galP* puede ser amplificado por PCR a partir de ADN cromosomal de *E. coli*, para luego ser ligado a un promotor fuerte y expresarse en un plásmido. Con base en resultados anteriores es de esperarse que la cepa *E. coli* PTS⁻ glucosa⁺/pTrc99A-*'aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA^{fb}*, muestre hasta un 100% de aumento en el rendimiento de la producción de L-Tir a partir de glucosa (Baez, Bolivar et al, 2001).

Una modificación adicional que se esperaría mejore el desempeño de la cepa de producción de L-Tir, consiste en la inactivación del gene que codifica para el regulador TyrR. Como se mencionó, esta proteína reprime la expresión de genes biosintéticos cuando L-Tir está presente en el medio de cultivo (figura 8.1A). El control de TyrR sobre los genes *'aroF* y *tyrA^{fb}*, fue eliminado al reemplazar sus promotores nativos por el promotor *trc*, el cual ahora puede ser controlado por IPTG. Sin embargo, en la cepa de producción los genes *aroL* y *tyrB*, aún se encuentran sujetos a represión por TyrR. Los genes *aroL* y *tyrB* codifican para las enzimas shikimato sintasa y aminotransferasa, respectivamente. Estas juegan un papel importante sobre la capacidad de síntesis de L-Tir. La eliminación del gene *tyrR*, puede efectuarse como se mencionó arriba, por transducción de la mutación correspondiente a partir de la colección Keio (Baba, Ara et al, 2006). Se ha reportado que la inactivación del gene *tyrR* causa un aumento de aproximadamente el 100% en la tasa específica de producción de L-Tir (Munoz, Hernandez-Chavez et al, 2011).

La cepa: *E. coli* PTS⁻ glucosa⁺ *tyrR*/pTrc99A-*'aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA^{fb}*, está diseñada para lograr la producción de L-Tir con un alto rendimiento a partir de glucosa. Las modificaciones realizadas tienen como fin: redirigir el flujo de carbono del metabolismo central (PEP y E4P) hacia la vía de síntesis de L-Tir. Es importante señalar que una consecuencia de lo anterior es: una reducción en la capacidad celular para generar

energía y precursores para su crecimiento. La cepa resultante mostrará una alta capacidad de producción de L-Tir, pero su velocidad de crecimiento será menor al de una cepa sin modificar. Considerando que el objetivo de un proceso de producción es: maximizar la productividad volumétrica. Se debe tomar en cuenta que una cepa que posea todas las modificaciones para maximizar flujo hacia un producto deseado, puede no ser la que muestre el mejor desempeño si también debe tener una tasa de crecimiento relativamente alta. La construcción de cepas de producción de manera progresiva, como se mostró aquí, permite ir caracterizando a cada una de ellas y así poder determinar cuál es la más adecuada para desarrollar un proceso fermentativo con alta productividad. En este caso, lo recomendable es evaluar a las siguientes cepas bajo condiciones de producción, para elegir a aquella que muestre la mayor productividad volumétrica:

E. coli /pTrc99A-*'aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA*^{fb}r

E. coli PTS⁻ glucosa⁺ /pTrc99A-*'aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA*^{fb}r

E. coli PTS⁻ glucosa⁺ *tyrR*/pTrc99A-*'aroF*/pACYC184-*tktA*/pCL1920-*tyrA*^{fb}r

Finalmente, se debe resaltar que el diseño de una cepa mediante ingeniería metabólica es, solo uno de los pasos necesarios para lograr constituir un proceso fermentativo de producción. Otro elemento esencial consiste en definir las condiciones y el tipo de cultivo que favorezcan el desempeño de la cepa de producción. Entre los factores a considerar se encuentran: la composición del medio del cultivo, la concentración y punto de adición del inductor IPTG; los cuales deben ser determinados experimentalmente para cada cepa de producción.

Problema 8.2 Estrategia de clonación *in silico* para la producción de proteína recombinante en *Escherichia coli*

Juan Carlos Sigala Alanís

Contexto del problema

La tecnología del ADN recombinante ha permitido la producción de proteínas heterólogas de interés comercial, contribuyendo a la consolidación de la biotecnología moderna a partir de los años setenta. A la fecha, esta tecnología ha continuado progresando y es de uso generalizado en la academia y en la industria. Sin embargo, los conceptos y técnicas esenciales que le dieron origen básicamente son los mismos.

El presente problema tiene como objetivo: recrear “*in silico*” (llamadas así las técnicas de análisis computacional usando algoritmos de simulación y predicción) una de las primeras estrategias de producción de proquimosina (Emtage, Angal et al, 1983). La quimosina, también conocida como rennina, es una enzima proteolítica de importancia en la industria alimentaria, cuya actividad consiste en romper la κ -caseína y contribuir con ello a la coagulación de la leche, lo que es necesario para la producción de queso. Usualmente se produce el zimógeno proquimosina recombinante en *E. coli* (Kawaguchi, Kosugi et al, 1987).

La principal ventaja derivada de resolver este ejercicio es que: estrategias similares se pueden plantear para la clonación de cualquier fragmento de ADN sintético, obtenido por síntesis química o por PCR (por sus siglas en inglés, polymerase chain reaction) (Reacción en Cadena de la Polimerasa o Cadena de Reacciones de la Polimerasa), para la producción de una gran variedad de proteínas. Finalmente, el llevarlo a cabo *in silico* representa un primer paso en el planteamiento de una estrategia experimental.

Requerimientos

- Programa SerialCloner© (*freeware*), que se puede descargar en la página: http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
- Acceso a internet.

Planteamiento del problema

1) Considerando la secuencia de aminoácidos de la proquimosina bovina (Foltmann, Pedersen et al, 1977).

```
MAEITRIPLYK GKSLRKALKEHGLLEDFLQKQYGISSKYS GFGEVASVPLTN-  
YLD SQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRFDPKSS-  
TFQNLGKPLSIHYGTGSMQ GILGYDTVTVSNIVDIQQT VGLSTQEPGDVFT-  
YAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTL-  
GAINPSYYTGLHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVACEGGCQAILDTGTSKL-  
VGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMP TVVFEINGKMYPLTPSAYTS-  
QDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVFIREYYS VFDRANNLVGLAKAI
```

¿Cuál sería la secuencia de ADN a partir de la cual se pudiera producir esta proteína en *E. coli*?

2) ¿Cuáles son los nucleótidos que deberán adicionarse en los extremos de la secuencia de ADN de la proquimosina para tener sitios de restricción *Sma*I y *Hind*III en el extremo 5' y 3', respectivamente? Mostrar la secuencia de doble cadena.

3) Representar *in silico* la clonación del fragmento anterior en el vector pTrc99A, haciendo uso de SerialCloner©. Para ello:

3a) Obtener la representación *in silico* del vector pTrc99A.

3b) Realizar una digestión virtual del plásmido pTrc99A y de la secuencia de ADN de la quimosina; con las enzimas de restricción *Sma*I y *Hind*III, respectivamente. Generar los archivos correspondientes y mostrar la representación gráfica de ambos.

3c) Realizar la ligación virtual de ambos fragmentos. Generar el archivo correspondiente y mostrar su representación gráfica.

3d) ¿Cuál es la utilidad del vector pTrc99A?

4) A partir de la estrategia virtual desarrollada, plantear un método experimental real para llevar a cabo en el laboratorio la clonación del gen de la quimosina bovina en pTrc99A. ¿Por qué no es posible emplear las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI en una estrategia alternativa?

5) De acuerdo a lo que señala la literatura, ¿cómo se debe procesar la proquimosina para obtener la quimosina activa?

Respuestas al problema

1) Considerando la secuencia de aminoácidos de la proquimosina bovina:

MAEITRIPLYK GKSLRKALKEHGLLEDFLQKQQYGISSKYS GFGEVASVPLTN-
YLD SQYFGKIYLGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCKSNACKNHQRF DPRKSS-
TFQNLGKPLSIHYGTGSMQGILGYD TVTVSNIVDIQQT VGLSTQEPGDVFT-
YAEFDGILGMAYPSLASEYSIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQESMLTL-
GAINPSYYTGLSHWVPVTVQQYWQFTVDSVTISGVVACEGGCQAILDTGTSKL-
VGPSSDILNIQQAIGATQNQYGEFDIDCDNLSYMP TVVFEINGKMYPLTPSAYTS-
QDQGFCTSGFQSENHSQKWILGDVFIREYYS VFDRANNLVGLAKAI

¿Cuál sería la secuencia de ADN a partir de la cual se pudiera producir esta proteína en *E. coli*?

Empleando SerialCloner®:

- i. Abrir el programa (figura 8.3).
- ii. En la ventana “Protein” elegir la opción “New Protein Sequence”.
- iii. Copiar y pegar la secuencia anterior. Nombrar y salvar el nuevo archivo.
- iv. Seleccionar la secuencia completa de aminoácidos, abrir la ventana “Protein” y elegir la opción “Reverse Translate Selected Sequence”.
- v. Verificar en la ventana “Protein” / “Manage Codon Usage Table” que se encuentre seleccionado el uso preferencial de codones de *E. coli*.

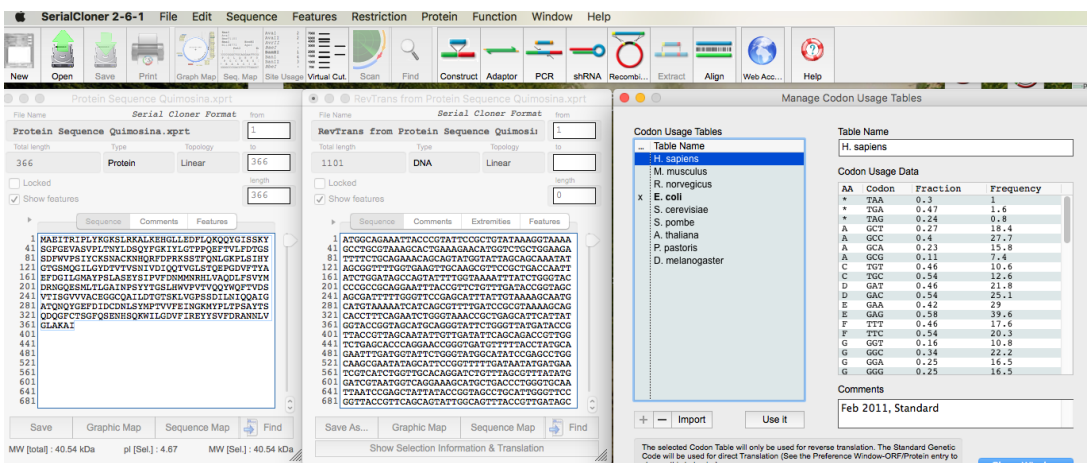


Figura 8.3. Distintas ventanas del programa SerialCloner®.

La secuencia de ADN obtenida es la siguiente:

ATGGCAGAAATTACCCGTATTCGGCTGTATAAAGGTAAAAGCCTGCGTAAAGCACTGAAAGAACATGGTCTGCTGGAAGA
 TTTTCTGCAGAAACAGCAGTATGGTATTAGCAGCAAATATAGCGGTTTGGTGAAGTTGCAAGCGTTCGGCTGACCAATT
 ATCTGGATAGCCAGTATTTTGGTAAAATTTATCTGGGTACCCCGCCGAGGAATTTACCGTTCTGTTTGATACCGGTAGC
 AGCGATTTTGGGTTCGGAGCATTTATTGTAAAAGCAATGCATGTAAAATCATCAGCGTTTTGATCCGCGTAAAAGCAG
 CACCTTTCAGAATCTGGGTAAACCGCTGAGCATTATTATGGTACCGGTAGCATGCAGGGTATTCTGGGTTATGATACCG
 TTACCGTTAGCAATATGTTGATATTCAGCAGACCGTTGGTCTGAGCACCCAGGAACCGGGTGATGTTTTTACCTATGCA
 GAATTTGATGGTATTCTGGGTATGGCATATCCGAGCCTGGCAAGCGAATATAGCATTCGGTTTTTATAATATGATGAA
 TCGTCATCTGGTTGCACAGGATCTGTTTAGCGTTTATATGGATCGTAATGGTCAGGAAAGCATGCTGACCCGCGGTGCAA
 TTAATCCGAGCTATTATACCGGTAGCCTGCATTGGGTTCCGGTTACCGTTCAGCAGTATTGGCAGTTTACCGTTGATAGC
 GTTACCATTAGCGGTGTTGTTGTTGCATGTGAAGTGGTGTGTCAGGCAATTCTGGATACCGGTACCAGCAAACCTGGTTGG
 TCCGAGCAGCGATATCTGAATATTCAGCAGGCAATTGGTGC AACCCAGAATCAGTATGGTGAATTTGATATTGATTGTG
 ATAATCTGAGCTATATGCCGACCGTTGTTTTGAAATTAATGGTAAAATGTATCCGCTGACCCGAGCGCATATACCAGC
 CAGGATCAGGGTTTTTGTACCAGCGTTTTTCAGAGCGAAAATCATAGCCAGAAATGGATTCTGGGTGATGTTTTTATTCG
 TGAATATTATAGCGTTTTTGTGATCGTGCAAATAATCTGGTGGTCTGGCAAAGCAATTTAA

2) ¿Cuáles son los nucleótidos que deberán adicionarse en los extremos de la secuencia de ADN del inciso 1), para tener sitios de restricción *Sma*I y *Hind*III en el extremo 5' y 3', respectivamente?

Las secuencias de reconocimiento de estas enzimas son las siguientes:

*Sma*I

5' CCC ↓ GGG 3'

3' GGG ↑ CCC 5'

*Hind*III

5' A ↓ AGCTT 3'

3' TTCGA ↑ A 5'

La flecha indica el sitio de corte de las enzimas de restricción, *SmaI* genera extremos romos y *HindIII* extremos cohesivos.

Adicionalmente, es necesario adicionar al menos 6 pares de bases en los extremos de la secuencia, como sitio ancla para que la enzima de restricción funcione adecuadamente.

TAAGCACCCGGGATGGCGGAAATC-----GCGAAAGCGATCA**AAGCTT**TAAGCA

Secuencia ancla

Sitio de restricción *SmaI*

Sitio de restricción *HindIII*

Secuencia de interés.

La doble cadena de este fragmento se puede obtener de la siguiente forma:

- i. Abrir un nuevo archivo en el programa SerialCloner©.
- ii. Copiar y pegar la secuencia anterior. Nombrar y salvar el nuevo archivo.
- iii. Abrir la ventana “Sequence Map”.
- iv. En la nueva ventana dejar sólo activas las casillas “Show reverse strand”.
- v. La secuencia de doble cadena que se mandaría sintetizar es la siguiente (figura 8.4):

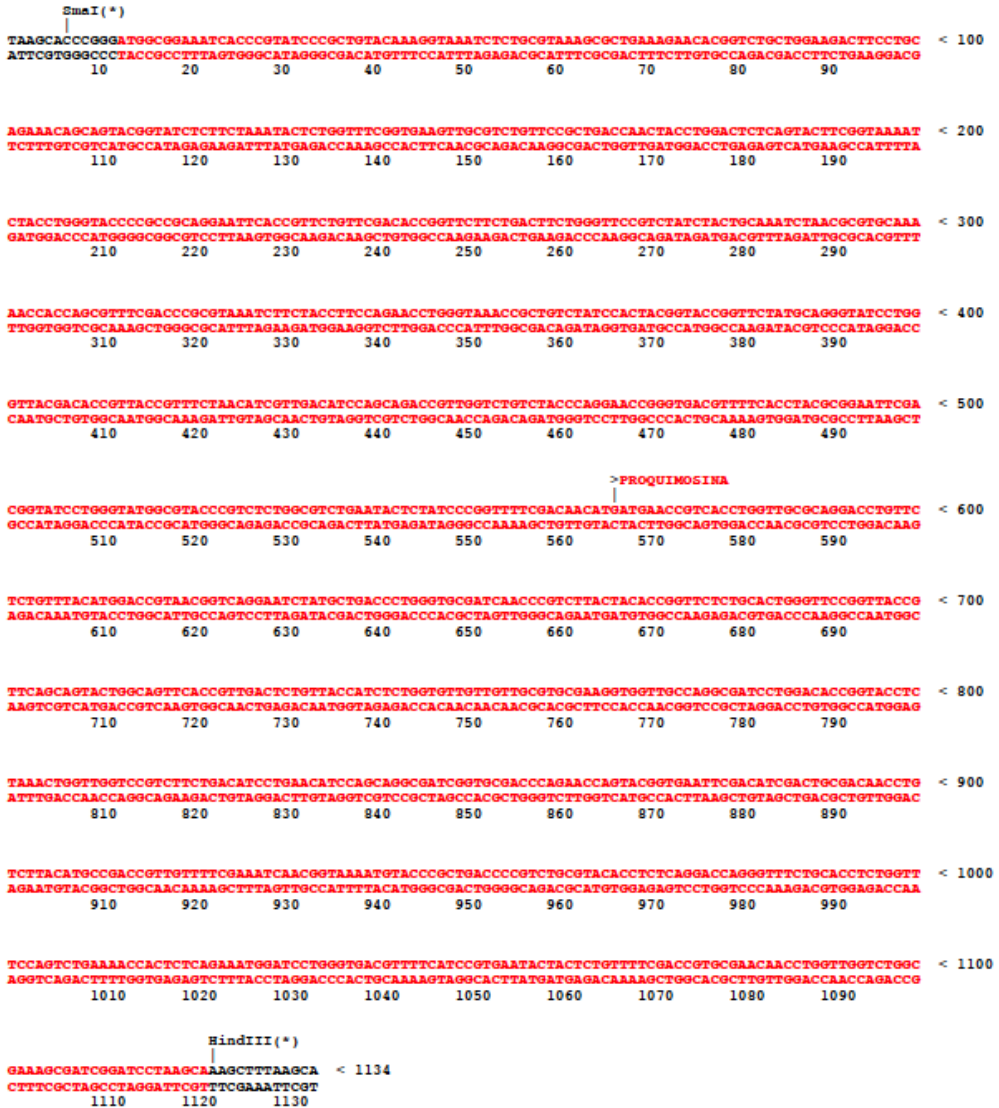


Figura 8.4. Secuencia de doble cadena para sintetizar.

3) Representar *in silico* la clonación del fragmento anterior en el vector pTrc99A haciendo uso de SerialCloner®. Para ello:

3a) Obtener la representación *in silico* del vector pTrc99A.

Para ello:

- i. Acceder al sitio: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- ii. Obtener la secuencia de nucleótidos del vector en NCBI en formato fasta, figura 8.5.

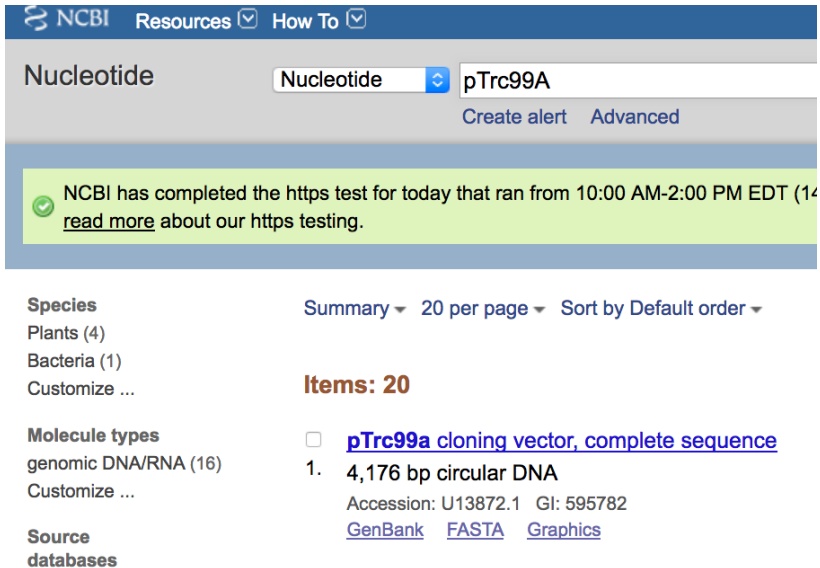


Figura 8.5. Registro NCBI

- iii. Copiar y pegar en SerialCloner© esta secuencia en un archivo nuevo.
- iv. Nombrar y salvar el archivo.
- v. En la ventana “Sequence” elegir “Circularize”.
- vi. En la ventana “Features” elegir “Scan Sequence”.
- vii. Abrir la ventana “Graphic Map” (figura 8.6).

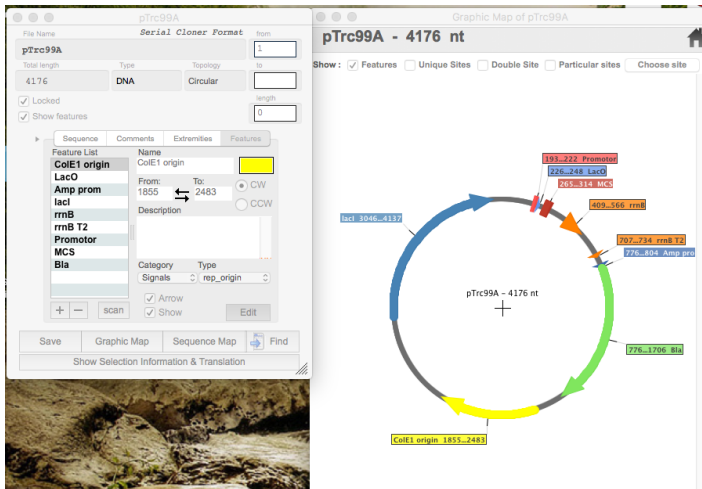


Figura 8.6. Ventana “Graphic Map”.

viii. Desactivar la casilla “Unique Sites”. Se observa en la imagen una representación del plásmido pTrc99A. Salvar el archivo.

3b) Realizar una digestión virtual del plásmido pTrc99A y de la secuencia de ADN de la proquimosina, con las enzimas de restricción *SmaI* y *HindIII*. Generar los archivos correspondientes y mostrar la representación gráfica de ambos.

Para ello:

- i. En la ventana “Function” elegir “Build a Construct”.
- ii. En “Fragment #1”/ “Select DNA 1” elegir el archivo pTrc99A.
- iii. En la ventana de la izquierda marcar la función “Particular Sites” y en “Choose sites” señalar las enzimas *SmaI* y *HindIII* (figura 8.7).

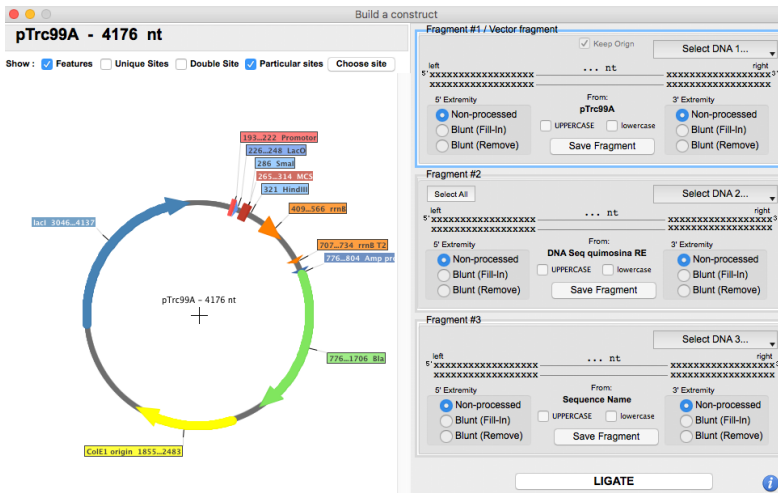


Figura 8.7. Elección de funciones para analizar el fragmento.

- iv. Dar un clic con el mouse al recuadro en azul “3321 *HindIII*”, e inmediatamente oprimir dos veces al recuadro “*SmaI* 286”; para elegir el corte y fragmento generado que se requiere (representado en negro dentro del plásmido), figura 8.8.

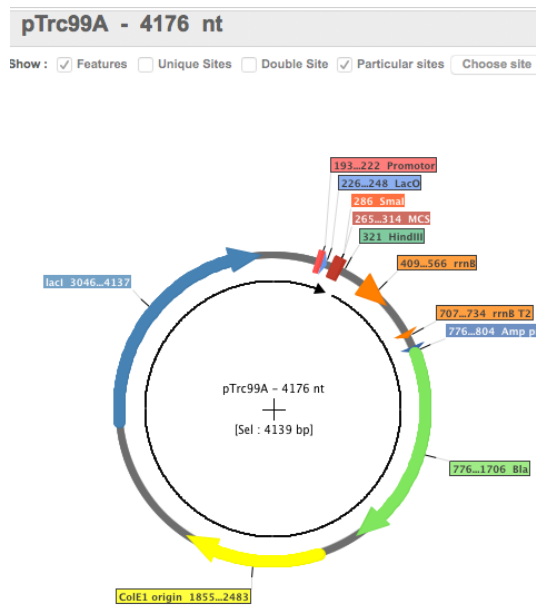


Figura 8.8. Elección de corte y generación de fragmento requerido.

- v. En el recuadro “Fragment #1” oprimir “ Save Fragment”, nombrar archivo y guardar.
- vi. De manera similar, en “Fragment #2”/ “Select DNA 2”, elegir el archivo Quimosina con sitios de restricción y seguir los pasos anteriores para generar el archivo correspondiente (figura 8.9).

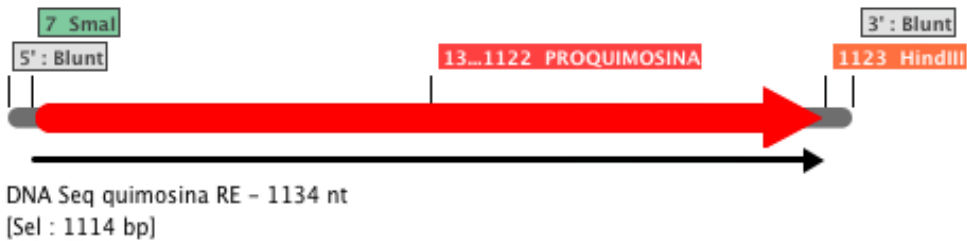


Figura 8.9. Visualización del fragmento elegido con sitios de restricción.

3c) Realizar la digestión y la ligación virtual de ambos fragmentos. Generar el archivo correspondiente y su representación gráfica.

Para ello:

- i. En la misma ventana de “Build a Construct”, teniendo seleccionadas las enzimas de restricción que harán los cortes (flechas negras en el fragmento plasmídico y de ADN), oprimir el botón ligar.
- ii. Salvar el nuevo archivo generado y mostrar la representación gráfica (figura 8.10).

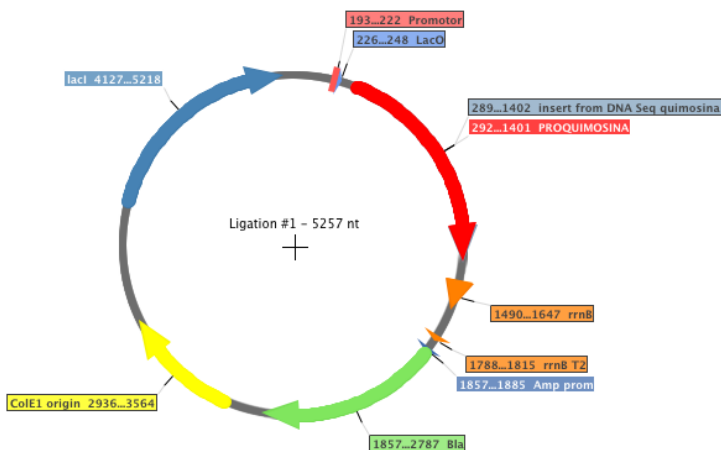


Figura 8.10. Visualización gráfica.

3d) ¿Cuál es la utilidad del vector pTrc99A?

Este es un vector de expresión que cuenta con el promotor híbrido fuerte *trc*, derivado de los promotores de *E. coli trp* y *lacUV5*. El promotor sintético *trc* es inducible con IPTG y permite transcribir genes a un nivel elevado. Cuenta con un gen que confiere resistencia a ampicilina como marcador de selección.

4) A partir de la estrategia virtual desarrollada, plantear un método experimental real para llevar a cabo en el laboratorio la clonación del gen de la quimosina bovina en pTrc99A. ¿Por qué no es posible emplear las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* en una estrategia alternativa?

La respuesta al enunciado 4 es variable dependiendo de las enzimas comerciales utilizadas. Se pueden seguir los protocolos de varios de los proveedores de enzimas que se pueden encontrar en la red.

No es posible emplear las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* debido a que cortan en distintos puntos el fragmento de ADN que se quiere clonar.

5) De acuerdo a lo que señala la literatura, ¿cómo se debe procesar la proquimosina para obtener la quimosina activa?

El zimógeno proquimosina es convertido en quimosina activa en condiciones ácidas. La ventaja de producir [Met]-proquimosina recombinante en *E. coli* consiste en generar *in vitro* la quimosina activa al acidificar el medio en donde se encuentre. Adicionalmente, la proquimosina producida en *E. coli* suele formar cuerpos de inclusión, lo cual puede favorecer la obtención de la proteína.

Problema 8.3 Cálculo de velocidades, tasas específicas y rendimientos

Roberto Olivares Hernández

Introducción

Como parte de la cuantificación del metabolismo celular se requiere determinar las cinéticas de crecimiento, consumo y producción; para posteriormente medir las velocidades a las que el microorganismo está consumiendo el sustrato, o produciendo un metabolito. Igualmente estas tasas se utilizan para el cálculo de los rendimientos.

Estas velocidades o tasas nos permiten inferir las capacidades que tiene el metabolismo como resultado de la operación de la red metabólica. Por lo que es importante poder lograr una cuantificación lo más exacta posible.

Imaginemos el caso de un sistema experimental (un biorreactor o un matraz), en donde se cultiva una levadura como *Saccharomyces cerevisiae* utilizando glucosa como sustrato. En este caso el experimentador logra medir la concentración de glucosa y la concentración de células en distintos tiempos. Con estos datos puedes construir una gráfica de concentración vs. tiempo, tanto para la glucosa como para la biomasa celular. La ecuación general del balance de materia en un biorreactor operando en modo lote, se reduce a dos términos; ya que es un sistema cerrado que no intercambia materia con los alrededores. Por lo tanto, la ecuación general del balance de materia se reduce a:

Generación de materia dentro del sistema - consumo de materia dentro del sistema = acumulación de materia dentro del sistema (8.1)

Los términos de generación y consumo de materia se relacionan con las tasas de producción y consumo de un componente en específico; en este ejemplo, se consume la glucosa y se produce la biomasa. A continuación se representa de manera simplificada el balance para el sistema de este ejemplo:

tasa de producción (o consumo del compuesto i) = acumulación del compuesto i en el volumen (8.2)

El término acumulación del compuesto se puede definir en función de las variables de: volumen de trabajo V , concentración de glucosa o biomasa C_i , masa de glucosa o biomasa M_i y tiempo t .

$$\text{Acumulación del compuesto } i \text{ en el volumen de trabajo} \rightarrow \frac{dM_i}{dt} \text{ o } \frac{d(VC_i)}{dt} \quad (8.3)$$

Ya que el término $VC_i = M_i$, y las unidades de este término son mol/s, unidades de tasa. Se puede definir la tasa de dos maneras:

$$\text{Tasa de producción (o consumo) del compuesto } i = \frac{d(VC_i)}{dt} \quad (8.4)$$

o

$$\text{Tasa de producción (o consumo) del compuesto } i = \frac{d(M_i)}{dt} \quad (8.5)$$

Con estas ecuaciones se puede deducir que: la tasa de producción (o consumo) de un compuesto se puede aproximar estimando el gradiente (derivada) que representa el término acumulación; y para evaluarla se requiere conocer el volumen de trabajo y la concentración o la masa del componente i . Las derivadas (8.4) y (8.5) se pueden evaluar como:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} \cong \frac{(VC_i)|_{t_2} - (VC_i)|_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (8.6)$$

Para la masa:

$$\frac{dM_i}{dt} \cong \frac{M_i|_{t_2} - M_i|_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (8.7)$$

Estas ecuaciones implican que, para evaluar la tasa, se requieren dos valores en dos tiempos distintos, siendo este método uno de los más sencillos para estimar el gradiente y obtener la tasa. A continuación, se presentan el procedimiento para el cálculo de velocidades y tasas específicas (Heijnen, 2009).

Cálculo de velocidades de consumo y producción

Para poner en práctica lo anterior, consideremos el siguiente muestreo (tabla 8.3) que se obtuvo en una fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, en donde se considera que la pérdida de volumen debido a la evaporación que es igual a 0.02 L/h

Tabla 8.3. Datos de fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Tiempo (h)	Volumen (L)	C_{gluc} (mmol glucosa/l)	C_{bio} (C-mmol biomasa/l)
0	1	111.11	2.33
1	0.98	111.44	2.49
2	0.96	111.68	2.68
4	0.92	111.86	3.09
8	0.84	110.60	4.13
16	0.68	96.65	7.61

Antes de iniciar los cálculos, observemos estos datos. En este experimento existe un proceso de evaporación donde se cuantifica el volumen en cada punto. Observamos también que este disminuye con el tiempo; sin embargo, la concentración de glucosa se incrementa y luego disminuye; pero este efecto es debido al cambio de volumen. Para realizar el cálculo de las tasas, los datos de la tabla se pueden manipular multiplicando volumen por concentración y obtener la masa de glucosa y biomasa (tabla 8.4).

Tabla 8.4. Cálculos de la masa de biomasa y glucosa de los datos de fermentación.

Tiempo (h)	$M_{gluc} = VC_{gluc}$ (mmol glucosa)	$M_{bio} = VC_{bio}$ (C-mmol biomasa)
0	111.11	2.33
1	109.21	2.44
2	107.21	2.57
4	102.91	2.84
8	92.90	3.47
16	65.72	5.18

En la tabla 8.4 ahora se ve claramente que la acumulación de biomasa se debe al consumo de masa de glucosa. En una gráfica de M_{gluc} vs. t , si se conectan los puntos con una recta, la pendiente de esta es la tasa de glucosa. Y lo mismo para la biomasa. Evaluando la pendiente en cada punto de la siguiente manera:

$$\frac{dM_{gluc}}{dt} \cong \frac{M_{gluc}(t_2) - M_{gluc}(t_1)}{t_2 - t_1} \quad (8.8)$$

Con la ecuación (8.8) se obtienen los valores de la tasa para cada intervalos de tiempo, ver tabla 8.5.

Tabla 8.5. Evaluando la pendiente.

Tiempo (h)	$\frac{dM_{gluc}}{dt}$ (mmol glucosa/h)	$\frac{dM_{bio}}{dt}$ (C-mmol biomasa/h)
0-1 h	-1.90	0.12
1-2 h	-2.00	0.13
2-4 h	-2.15	0.14
4-8 h	-2.50	0.16
8-16 h	-3.40	0.21

Se observa en la tabla (8.5) que la pendiente es negativa para la glucosa, puesto que es un sustrato y se está consumiendo; mientras que para la biomasa es positiva ya que se está produciendo. Otra tendencia que se puede ver es el valor de las tasas, el cual no es constante y su valor se incrementa, mientras la concentración de glucosa disminuye. Esta explicación se puede fundamentar, con el siguiente tratamiento del término acumulación, el cual se puede definir de dos maneras equivalentes:

$$\frac{dM_i}{dt} = \frac{d(VC_i)}{dt} \tag{8.9}$$

Si el volumen V varía en el tiempo, tal como se ve en la tabla anterior, se debe desarrollar la expresión como:

$$\frac{dM_i}{dt} = \frac{d(VC_i)}{dt} = V \frac{dC_i}{dt} + C_i \frac{dV}{dt} \tag{8.10}$$

En esta ecuación, se debe interpretar que el cambio en la cantidad de masa del componente (M_i), se debe a dos contribuciones: los cambios en la concentración y los cambios en el volumen.

Esto conduce a que se debe tener en mente dos consideraciones para el cálculo de las tasas: la primera es que se debe asegurar que el volumen permanece constante, o su cambio es despreciable, para sólo considerar el término que involucra los cambios de concentración.

Para la segunda consideración se evalúan los valores de la tabla 8.3, pero ahora sólo con la concentración, y se repiten los cálculos de la derivada de forma discreta, los resultados se tienen en la tabla 8.6.

Tabla 8.6. Cálculo de velocidades de cambio de concentración.

Tiempo (h)	$\frac{dC_{gluc}}{dt}$ (mmol glucosa/L/h)	$\frac{dC_{bio}}{dt}$ (C-mmol biomasa/L/h)
0-1 h	0.33	0.17
1-2 h	0.24	0.18
2-4 h	0.09	0.21
4-8 h	-0.32	0.26
8-16 h	-1.74	0.44

Como se puede ver en la tabla 8.6, la tasa de concentración de glucosa cambia de signo, esto nos lleva a otra consideración cuando se realizan los cálculos de las tasas: se debe considerar el volumen de muestreo con el cual se cuantifican las concentraciones del compuesto de interés. Cuando se toma una muestra de un volumen determinado, esto implica que se contiene el volumen del compuesto más el de la biomasa. Cuando se prepara la muestra para analizar la concentración se separa la biomasa quedando lo que se conoce como el sobrenadante, el cual contiene el compuesto de interés. Siendo estrictos, el volumen del sobrenadante no es igual al de la muestra. En términos de unidades, la concentración que se mide son: los moles de compuesto sobre el volumen de sobrenadante (mol compuesto/L sobrenadante). Mientras que el volumen de la muestra es la suma del sobrenadante más el de la biomasa. La diferencia de estos depende del volumen de biomasa el cual puede variar en un rango de 5-20%; y está también depende del tiempo.

Cálculo de tasas específicas

En las tablas 8.6 y 8.5, se calculó la velocidad de consumo y producción para un sistema operando en modo lote, y estas velocidades están en unidades de mmol/h. Los datos se calcularon a partir de mediciones de concentración de glucosa y biomasa como una función del tiempo.

De los cálculos anteriores, se ve que la tasa de consumo de glucosa se incrementa mientras que la concentración disminuye. Esta observación se puede explicar analizando que: la biomasa se incrementa, por lo que existe un mayor número de células consumiendo glucosa. Por lo tanto, la tasa total calculada anteriormente nos permite conocer los cambios en la

velocidad de consumo; no obstante, existe otra tasa que tiene mayor relevancia para la evaluación de los cambios y se denomina: tasa específica de consumo (q_s) o de producción de biomasa (q_x). La particularidad de este parámetro es que la velocidad total se normaliza por la masa de células presentes, por lo que en general cualquier tasa específica; sea de consumo o de producción se escribe como:

$$q_i = \frac{\text{tasa } i}{\text{masa de celulas}} = \frac{\text{tasa } i}{M_x} [=] \frac{\text{mol } i / \text{h}}{\text{mol } X} \quad (8.11)$$

La relevancia de esta tasa específica es que se trata de una medida que permite conocer la actividad de la célula presente. Por lo tanto, su valor está influenciado por la capacidad metabólica de la célula y el tipo de estímulo ambiental al que están expuestos, tales como: concentración de oxígeno, glucosa, dióxido de carbono, pH y temperatura. Por medio del análisis de unidades, se puede observar que las tasas específicas se evalúan a partir de las velocidades y la cantidad de biomasa presente. En particular, por razones históricas la tasa específica de producción de biomasa (q_x), se define como μ .

$$\mu (= q_x) = \frac{\text{tasa } x}{M_x} [=] \frac{\text{mol } X / \text{h}}{\text{mol } X} = \frac{1}{h} \quad (8.12)$$

Esto demuestra que μ tiene las unidades de tiempo en h^{-1} .

En la tabla 8.7, se muestra el cálculo de la tasa específica a partir de datos experimentales de un cultivo modo lote. En este procedimiento se observa que se calculan las tasas utilizando la forma discreta de las derivadas, tal como se hizo con la ecuación 8.7.

Tabla 8.7. Cálculo de tasa específica.

Tiempo (h)	$\frac{dM_{gluc}}{dt} \left(\frac{\text{mmol glucosa}}{h} \right)$	$\frac{dM_{bio}}{dt} \left(\frac{\text{mmol } X}{h} \right)$	M_x promedio (mmol X)	$-q_s \left(\frac{\text{mmol glucosa}}{h \text{ mmol } X} \right)$	$(h^{-1})^{\mu}$
0-1 h	-1.90	0.12	2.39	0.80	0.05
1-2 h	-2.00	0.13	2.51	0.80	0.05
2-4 h	-2.15	0.14	2.71	0.79	0.05
4-8 h	-2.50	0.16	3.15	0.79	0.05
8-16 h	-3.40	0.21	4.32	0.79	0.05

Se calcula la biomasa promedio, M_x , entre dos intervalos de tiempo. En la tabla 8.7 se puede notar que las tasas específicas de consumo de glucosa y la tasa específica de producción de biomasa, son relativamente constantes en un experimento por lotes. Sin embargo, también es importante considerar la desviación estandar de estos cálculos cada vez que sucedan y reportarlos.

Para el caso de un cultivo por lote, no hay que olvidar que la tasa específica de biomasa se considera la tasa máxima, μ_{max} , ya que el crecimiento de las células sólo está limitado por cantidad de la fuente de carbono. En conclusión, las tasas específicas nos permiten inferir las capacidades metabólicas de las células, mas aún, es uno de los primeros pasos para identificar las estrategias de ingeniería metabólica a implementarse, o evaluar las que se han aplicado.

Cálculo de tasa específica volumétrica

Generalmente, en un diseño existen dimensiones relevantes para la económica del proceso. El volumen del equipo incide directamente en los costos y es necesario poder estimar estos. Así como la tasa específica de crecimiento permite conocer la actividad de las células, se requiere calcular la tasa específica volumétrica* para poder estimar los volúmenes de equipo o configuraciones que se requieren para llevar a cabo los cultivos. Otro parámetro de importancia a calcular es el rendimiento, el cual permite evaluar el aprovechamiento del sustrato para la producción de metabolitos o biomasa. A nivel proceso, el rendimiento está asociado al costo variable, debido a la variación de la materia prima (Heijnen, 2009).

La definición de tasa específica volumétrica se define con las unidades de:

$$r_i = \frac{\text{tasa } i}{\text{Volumen de trabajo}} [=] \frac{\text{mol } i}{\text{h } L} \quad (8.13)$$

Pero, por medio del análisis de dimensiones se puede calcular:

$$r_i = q_i C_x [=] \frac{\text{mol } i}{\text{h } L} \quad (8.14)$$

de esta manera queda acoplada la tasa específica y la concentración de biomasa. De manera general se tiene, tanto para sustratos como productos, que las tasas específicas volumétricas se calculan como:

* No hay que confundir. En este problema le llamamos tasa volumétrica, sin embargo, también es la medida de la productividad del proceso. En cualquier caso, se trata del mismo parámetro.

$$r_s = q_s C_x \quad (8.15)$$

$$r_{O_2} = q_{O_2} C_x \quad (8.16)$$

$$r_p = q_p C_x \quad (8.17)$$

$$r_s = \mu C_x \quad (8.18)$$

Cálculo de rendimientos

Los rendimientos nos indican la eficiencia con la que se utiliza el sustrato para producir compuestos y biomasa pero al igual que las tasas específicas, este es un parámetro que se tiene que calcular considerando las variaciones en las condiciones experimentales.

Generalmente, durante un experimento en modo lote, los cambios de volumen pueden deberse a que se añade de forma continua una solución alcalina para el control de pH (tabla 8.8).

Tabla 8.8. Valores de cambio de volumen y concentración.

Tiempo (h)	$C_s \left(\frac{g}{L}\right)$	$C_x \left(\frac{g}{L}\right)$	V (L)
0	20	2	1
20	2	10	1.07

Para este ejemplo, la tabla muestra dos valores, los cuales pueden considerarse como un punto inicial y uno final de la fermentación. A partir de estos datos, uno de los valores relevantes a calcular es el rendimiento de biomasa sobre glucosa. Una manera de estimar el rendimiento, es a partir del valor de la masa en cada punto multiplicando el volumen por la concentración, ver tabla 8.9.

Tabla 8.9. Valores de cambio de volumen y masa.

Tiempo (h)	$C_s \left(\frac{g}{L}\right)$	$C_x \left(\frac{g}{L}\right)$	V (L)	M_s (g S)	M_x (gDWC)
0	20	2	1	20	2
20	2	10	1.07	2.14	10.7

Para calcular el rendimiento se debe estimar la cantidad de glucosa consumida y cantidad de biomasa producida.

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{10.7 - 2}{20 - 2.14} = 0.487 \frac{g X}{g S} \quad (8.19)$$

Para este cálculo se consideró el cambio de volumen utilizando las masas de cada componente. Se puede repetir la operación considerando que el volumen inicial se conserva, por lo que se utiliza la concentración. En este caso el cálculo del rendimiento es:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{10 - 2}{20 - 2} = 0.444 \frac{g X}{g S} \quad (8.20)$$

Comparando los valores de (8.19) y (8.20) se puede ver que existe una diferencia del 10%, lo cual puede ser despreciable al estar dentro del error experimental, pero se hace notar el efecto de no considerar el cambio de volumen. Y es que habrá situaciones donde posiblemente el cambio de volumen es considerable.

El cálculo de q_s y μ se puede lograr a partir de:

$$q_s = \frac{tasa}{M_x} \quad (8.21)$$

Donde la tasa es:

$$tasa_s = \frac{M_s(20) - M_s(0)}{(20 - 0)} = \frac{2.14 - 20}{20 - 0} = -0.893 \frac{g S}{h} \quad (8.22)$$

Para el cálculo de la tasa específica de consumo de glucosa, se ocupa el promedio de la masa de células producidas en este experimento, que es igual a 6.35 gDWC.

$$q_s = \frac{-0.893}{6.35} = 0.140 \frac{g S}{gDWC h} \quad (8.23)$$

Similarmente, para la tasa específica de crecimiento de biomasa:

$$tasa_x = \frac{M_x(20) - M_x(0)}{(20 - 0)} = \frac{-8.7}{20 - 0} = 0.435 \frac{g S}{h} \quad (8.24)$$

la tasa de crecimiento queda como:

$$\mu = \frac{0.435}{6.35} = 0.068 \frac{gDWC}{gDWC h} = 0.068 h^{-1} \quad (8.25)$$

Finalmente, el rendimiento es igual a:

$$\frac{Y_x}{S} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{0.068}{0.140} = 0.486 \frac{g S}{gDWC} \quad (8.26)$$

En este caso se demuestra que el calculo del rendimiento se puede lograr a partir tanto de valores de cambio de la masa en el tiempo, ecuación (8.19) como por medio de las tasas específicas (8.26).

Problema 8.4 Tasas específicas como parámetros de comparación entre experimentos a distintas escalas

Roberto Olivares Hernández

El cálculo de las tasas específicas estimadas en un laboratorio y el cálculo a escala piloto industrial pueden ser comparadas para evaluar la capacidad metabólica de un microorganismo. En la tabla 8.10 se tienen valores obtenidos a escala laboratorio.

Tabla 8.10. Valores a escala laboratorio.

Tiempo (h)	V (L)	$C_x \left(\frac{\text{g DWC}}{\text{L}} \right)$	$C_p \left(\frac{\text{g P}}{\text{L}} \right)$	M_x (gDWC)	M_p (g P)
10	1.05	5.0	2.0	5.2	2.1
14	0.73	10.3	5.2	7.5	3.8

A partir de estos valores se calcula la tasa promedio con los dos tiempos de muestreo.

$$tasa_x = \frac{dM_x}{dt} \cong \frac{7.2 - 5.2}{14 - 10} = 0.571 \frac{\text{gDWC}}{\text{h}} \quad (8.27)$$

Como se hizo en problemas anteriores de este capítulo (8.3 y 8.4), el cálculo final de la tasa específica de crecimiento:

$$\mu = \frac{tasa_x}{M_x} = \frac{0.571}{6.4} = 0.89 \text{ h}^{-1} \quad (8.28)$$

De igual manera para la tasa específica de producción, q_p .

$$tasa_p = \frac{dM_p}{dt} \cong \frac{3.8 - 2.1}{14 - 10} = 0.424 \frac{\text{g P}}{\text{h}} \quad (8.29)$$

$$q_P = \frac{\text{tasa}_P}{M_X} = \frac{0.375}{6.2} = 0.066 \frac{\text{g P}}{\text{gDWC h}} \quad (8.30)$$

Posteriormente con el mismo microorganismo se llevó a cabo en el cultivo condiciones por lote, pero a una escala mayor. Los datos están en la tabla 8.11.

Tabla 8.11. Valores a escala piloto.

Tiempo (h)	V (m ³)	C _X (g DWC / m ³)	C _P (g P / m ³)	M _X (g DWC)	M _P (g P)
10	5.0	5.0	2.0	25.0	10.0
14	4.9	7.3	3.8	35.9	18.7

Comparando las tablas 8.10 y 8.11, se puede leer que a las 10 horas la concentración es la misma tanto para la biomasa como para el producto, pero varía al tiempo de las 14 horas. Para poder evaluar la capacidad del microorganismo en ambos experimentos se calculan las tasas específicas del experimento a escala piloto:

$$\text{tasa}_X = \frac{dM_X}{dt} \cong \frac{35.9 - 25}{14 - 10} = 2.733 \frac{\text{gDWC}}{\text{h}} \quad (8.31)$$

$$\mu = \frac{\text{tasa}_X}{M_X} = \frac{2.733}{30.5} = 0.090 \text{ h}^{-1} \quad (8.32)$$

Y para la tasa específica de producción:

$$\text{tasa}_P = \frac{dM_P}{dt} \cong \frac{18.7 - 10}{14 - 10} = 2.171 \frac{\text{kg P}}{\text{h}} \quad (8.33)$$

$$q_P = \frac{\text{tasa}_P}{M_X} = \frac{2.171}{14.3} = 0.071 \frac{\text{kg P}}{\text{kg DWC h}} \quad (8.34)$$

En este caso, la diferencia en los valores calculados para ambas escalas es de menos del 10%. Por lo que se puede argumentar que no existe algún efecto importante en la eficiencia del microorganismo debido al escalamiento. La gran diferencia consiste en el cambio de volumen de ambos experimentos, el cual es mayor en el realizado a nivel laboratorio. En muchas ocasiones no sucede esto ya que la eficiencia de un microorganismo o célula a diferentes escalas depende de los efectos de transferencia de calor y masa que existen. En un sistema de grandes dimensiones no siempre se puede lograr el mismo control comparado con el que se puede lograr en escalas menores.

Problema 8.5 Cálculo de rendimiento máximo teórico en una red metabólica

Roberto Olivares Hernández

Introducción

Como parte de las estrategias de ingeniería metabólica para incrementar la capacidad productora de un microorganismo es la optimización del rendimiento por medio de eliminar o insertar genes que expresan las enzimas que catalizan las reacciones bioquímicas. El rendimiento depende directamente de la estructura de la red metabólica, es decir, las reacciones que están presentes y en forma específica, el rendimiento es un resultado de la estequiometría de las reacciones.

Cuando se plantea la producción de un metabolito de interés, el primer parámetro que se puede determinar es el rendimiento máximo teórico que se puede lograr, ya que este es la primera limitante impuesto por la termodinámica de las reacciones. Por ejemplo, en la figura 8.11 se tienen los pasos de reacción que conducen a la producción de isobutanol en *Escherichia coli*. Este alcohol es un biocombustible de segunda generación que no se produce naturalmente en *E. coli*, por lo que se llevó a cabo la ingeniería metabólica para lograrlo (Atsumi, Cann et al, 2008, Shen & Liao 2008). Para hacerlo se requieren dos moléculas de piruvato por molécula de isobutanol.

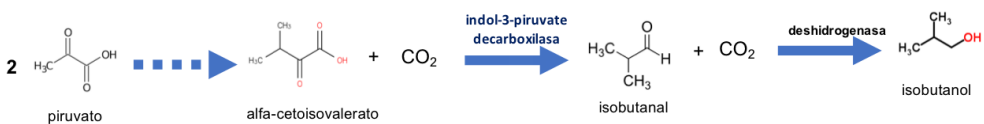


Figura 8.11. Pasos de reacción que conducen a la producción de isobutanol a partir de piruvato. La flecha punteada indica la condensación de pasos de reacción para efectos de simplificación del esquema y los cuales son lineales.

La estequiometría de estas reacciones nos indica que se requieren dos moles de piruvato para producir una mol de isobutanol, ya que existen dos pasos de reacciones en donde se pierde CO_2 . En términos de carbono, dos moléculas de piruvato proveen de tres átomos

cada uno, esto nos das seis átomos. En dos pasos de reacción se pierden dos átomos en forma de dióxido de carbono, por lo que al final nos quedan cuatro átomos de carbono para formar una molécula de isobutanol.

Hay que tener presente que la estequiometría es una relación que obedece a la ley de conservación de la masa y energéticamente está ligada a la termodinámica de las reacciones. En el caso de la producción de isobutanol se puede calcular su rendimiento a partir del piruvato de la siguiente manera:

$$Y_{\frac{iso}{pir}} = \frac{1 \text{ mol isobutanol}}{2 \text{ mol piruvato}} = 0.5 \frac{\text{mol isobutanol}}{\text{mol piruvato}} \quad (8.35)$$

Cambiando las unidades a gramos:

$$Y_{\frac{iso}{pir}} = 0.5 \frac{\text{mol isobutanol}}{\text{mol piruvato}} \left(\frac{\text{mol piruvato}}{88.06 \text{ g}} \right) \left(\frac{74.12}{\text{mol isobutanol}} \right) = 0.41 \frac{\text{g isobutanol}}{\text{g piruvato}} \quad (8.36)$$

Por lo anterior, no hay manera de cambiar este rendimiento y este rendimiento sería el máximo teórico posible, considerando que no se utiliza el piruvato para otros productos. Lo cual no es posible, ya que el piruvato se ocupa para generar más biomasa, más aún, este rendimiento disminuye si hay otros metabolitos que sean un producto final.

Como se mencionó en el problema 8.3, el rendimiento también se puede calcular a partir de las tasas específicas. De esta manera, se tendría por definición:

$$Y_{\frac{iso}{pir}} = \frac{q_{iso}}{-q_{pir}} = 0.42 \frac{\text{g isobutanol}}{\text{g piruvato}} \quad (8.37)$$

En donde el signo menos indica cualitativamente, en este caso, que se trata de una tasa específica de consumo. Despejando $-q_{pir}$,

$$q_{iso} = 0.42(-q_{pir}) \quad (8.38)$$

El resultado de la ecuación (8.36) está indicando que existe una proporcionalidad entre las tasas de consumo y producción, por lo tanto, el querer implementar alguna estrategia que incremente la tasa de consumo de piruvato no reflejaría incremento alguno en el rendimiento de isobutanol.

Pero, ¿Entonces que cambia el rendimiento? Se había mencionado que este es un parámetro que se debe optimizar por medio de estrategias de ingeniería metabólica, y una de

estas estrategias es la de eliminación o inserción de reacciones (es decir, genes que expresan la enzima que cataliza la reacción). Por lo tanto, siguiendo con el caso hipotético en donde no se produce biomasa a partir de piruvato, considérese que se logran modificar las reacciones que se tienen introduciendo nuevas reacciones que eliminen la pérdida de carbono en forma de CO_2 para la producción de isobutanol.

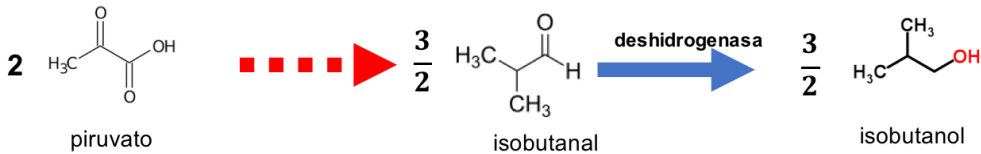


Figura 8.12. Producción de isobutanol por introduciendo nuevos pasos de reacción (flecha roja).

Para lograrlo se tuvo que eliminar las reacciones que se tenían y se introdujeron nuevas enzimas. La estequiometría cambia y por lo tanto se calcula el rendimiento:

$$Y_{\frac{\text{iso}}{\text{pir}}} = \frac{\frac{3}{2} \text{ mol isobutanol}}{2 \text{ mol piruvato}} = 0.75 \frac{\text{mol isobutanol}}{\text{mol piruvato}} = 0.63 \frac{\text{g isobutanol}}{\text{g piruvato}} \quad (8.39)$$

Hubo un incremento importante en el rendimiento gracias a la estrategia de eliminar e insertar genes que evitan la descarboxilación, pérdida de CO_2 . Esta estrategia es de hecho una de las que se siguen buscando para incrementar de manera importante el rendimiento el cual está reportado como 0.41 g isobutanol /g glucosa (Atsumi, Hanai et al, 2008). Recalculando, se sabe que por cada mol de glucosa se obtienen dos moles de piruvato, de la ecuación (8.35) se puede volver a calcular cambiando el valor:

$$Y_{\frac{\text{iso}}{\text{pir}}} = \frac{1 \text{ mol isobutanol}}{1 \text{ mol glucosa}} = 1 \frac{\text{mol isobutanol}}{\text{mol glucosa}} \quad (8.40)$$

Lo que equivale a:

$$Y_{\frac{\text{iso}}{\text{pir}}} = 1 \frac{\text{mol isobutanol}}{\text{mol glucosa}} \left(\frac{\text{mol glucosa}}{180.1 \text{ g}} \right) \left(\frac{74.12 \text{ g}}{\text{mol isobutanol}} \right) = 0.41 \frac{\text{g isobutanol}}{\text{g glucosa}} \quad (8.41)$$

Igual que en el caso del piruvato, no se considera que la glucosa se ocupe en la producción de biomasa. Finalmente, este rendimiento máximo teórico es un parámetro a alcanzar ya que al menos en el caso de la producción de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha reportado hasta el 98% del rendimiento máximo teórico (Villadsen, Nielsen et al, 2011).

Bibliografía

- Amann, E., B. Ochs & K. J. Abel (1988). Tightly Regulated Tac Promoter Vectors Useful for the Expression of Unfused & Fused Proteins in *Escherichia-Coli*. *Gene* 69(2): pp. 301-315.
- Atsumi, S., A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Chou, T. Hanai & J. C. Liao (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab Eng* 10 (6): pp. 305-311.
- Atsumi, S., T. Hanai & J. C. Liao (2008). Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451(7174): pp. 86-89.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner & H. Mori (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2.
- Baeshen, N. A., M. N. Baeshen, A. Sheikh, R. S. Bora, M. M. Ahmed, H. A. Ramadan, K. S. Saini & E. M. Redwan (2014). Cell factories for insulin production. *Microb Cell Fact* 13: pp. 141.
- Baez, J. L., F. Bolivar & G. Gosset (2001). Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity & yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnology & Bioengineering* 73(6): pp. 530-535.
- Bongaerts, J., M. Kramer, U. Muller, L. Raeven & M. Wubbolts (2001). Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids & derived compounds. *Metabolic Engineering* 3(4): pp. 289-300.
- Chandel, A. K., S. S. Da Silva & O. V. Singh (2013). Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical & metabolic engineering toward white biotechnology. *BioEnergy Research* 6(1): pp. 388-401.
- Chavez-Bejar, M. I., J. L. Baez-Viveros, A. Martinez, F. Bolivar & G. Gosset (2012). Biotechnological production of L-tyrosine & derived compounds. *Process Biochemistry* 47(7): pp. 1017-1026.

- Chavez-Bejar, M. I., A. R. Lara, H. Lopez, G. Hernandez-Chavez, A. Martinez, O. T. Ramirez, F. Bolivar & G. Gosset (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tyrosine production by expression of genes coding for the chorismate mutase domain of the native chorismate mutase-prephenate dehydratase & a cyclohexadienyl dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Applied & Environmental Microbiology* 74(10): pp. 3284-3290.
- De Anda, R., A. R. Lara, V. Hernandez, V. Hernandez-Montalvo, G. Gosset, F. Bolivar & O. T. Ramirez (2006). Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation & improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metabolic Engineering* 8(3): pp. 281-290.
- DeBerardinis, R. J. & C. B. Thompson (2012). Cellular metabolism & disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell* 148(6): pp. 1132-1144.
- Emtage, J. S., S. Angal, M. T. Doel, T. J. Harris, B. Jenkins, G. Lilley & P. A. Lowe (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(12): pp. 3671-3675.
- Erickson, B. & P. Winters (2012). Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology journal* 7(2): pp. 176-185.
- Ferrer-Miralles, N., J. Domingo-Espin, J. L. Corchero, E. Vazquez & A. Villaverde (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact* 8: pp. 17.
- Flores, N., J. Xiao, A. Berry, F. Bolivar & F. Valle (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 14(5): pp. 620-623.
- Flores, S., G. Gosset, N. Flores, A. A. de Graaf & F. Bolivar (2002). Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by C-13 labeling & NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering* 4(2): pp. 124-137.
- Foltmann, B., V. B. Pedersen, H. Jacobsen, D. Kauffman & G. Wybrandt (1977). Complete Amino-Acid Sequence of Prochymosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(6): pp. 2321-2324.
- Gosset, G. (2005). Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories* 4.

- Gosset, G., J. YongXiao & A. Berry (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* 17(1): pp. 47-52.
- Heijnen, J. J. (2009). Mass Balances, Rates & Experiments. *The metabolic pathway engineering handbook: Fundamentals*. Texas, USA: CRC Press.
- Hernandez-Montalvo, V., A. Martinez, G. Hernandez-Chavez, F. Bolivar, F. Valle & G. Gosset (2003). Expression of *galP* & *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport & increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology & Bioengineering* 83(6): pp. 687-694.
- Kawaguchi, Y., S. Kosugi, K. Sasaki, T. Uozumi & T. Beppu (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells & Its Enzymatic-Properties. *Agricultural & Biological Chemistry* 51(7): pp. 1871-1877.
- Leber, C. T., A. Aguirre & N. Da Silva (2013). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of short chain fatty acids & polyketide products. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 245.
- Lee, J. W., D. Na, J. M. Park, J. Lee, S. Choi & S. Y. Lee (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural & non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology* 8(6): pp. 536-546.
- Lutke-Eversloh, T. & G. Stephanopoulos (2005). Feedback inhibition of chorismate mutase/prephenate dehydrogenase (TyrA) of *Escherichia coli*: Generation & characterization of tyrosine-insensitive mutants. *Applied & Environmental Microbiology* 71(11): pp. 7224-7228.
- Lutke-Eversloh, T. & G. Stephanopoulos (2007). L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology & Biotechnology* 75(1): pp. 103-110.
- Maity, S. K. (2015). Opportunities, recent trends & challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 43: pp. 1427-1445.
- Martinez, J. L., L. F. Liu, D. Petranovic & J. Nielsen (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology* 23(6): pp. 965-971.
- Mattanovich, D., P. Branduardi, L. Dato, B. Gasser, M. Sauer & D. Porro (2012). Recombinant Protein Production in Yeasts. *Recombinant Gene Expression: Reviews & Protocols, Third Edition* 824: pp. 329-358.

- Munoz, A. J., G. Hernandez-Chavez, R. de Anda, A. Martinez, F. Bolivar & G. Gosset (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for improving L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis from glucose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38(11): pp. 1845-1852.
- Nakamura, C. E. & G. M. Whited (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14(5): pp. 454-459.
- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 4(4): pp. 207-211.
- Nigam, P. S. & A. Singh (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy & Combustion Science* 37(1): 52-68.
- Pandey, A., R. Höfer, M. Taherzadeh, M. Nampoothiri & C. Larroche (2015). *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Para, G., P. Lucciardi & J. Baratti (1985). Synthesis of L-Tyrosine by Immobilized *Escherichia-Intermedia* Cells. *Applied Microbiology & Biotechnology* 21(5): pp. 273-279.
- Patnaik, R. & J. C. Liao (1994). Engineering of *Escherichia-Coli* Central Metabolism for Aromatic Metabolite Production with near Theoretical Yield. *Applied & Environmental Microbiology* 60(11): pp. 3903-3908.
- Peralta-Yahya, P. P., F. Z. Zhang, S. B. del Cardayre & J. D. Keasling (2012). Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature* 488(7411): 320-328.
- Porro, D., M. Sauer, P. Branduardi & D. Mattanovich (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology* 31(3): pp. 245-259.
- Scheich, C., D. Kummel, D. Soumailakakis, U. Heinemann & K. Bussow (2007). Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Research* 35(6).
- Shen, C. R. & J. C. Liao (2008). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol & 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab Eng* 10(6): 312-320.
- Soccol, C. R., L. P. D. Vandenberghe, A. B. P. Medeiros, S. G. Karp, M. Buckeridge, L. P. Ramos, A. P. Pitarelo, V. Ferreira-Leitao, L. M. F. Gottschalk, M. A. Ferrara, E. P. D. Bon, L. M. P. de Moraes, J. D. Araujo & F. A. G. Torres (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status & perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 101(13): pp. 4820-4825.

- Stephanopoulos, G., A. A. Aristidou & J. Nielsen (1998). *Metabolic engineering: principles & methodologies*. London, England: *Academic press*.
- Tippmann, S., Y. Chen, V. Siewers & J. Nielsen (2013). From flavors & pharmaceuticals to advanced biofuels: Production of isoprenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal* 8(12): pp. 1435-1444.
- Villadsen, J., J. H. Nielsen, G. Lidén & J. H. Nielsen (2011). *Bioreaction engineering principles*. New York. London, England: *Springer*.

SEMBLANZAS

PROFESORES

Dra. Dolores Reyes Duarte

Profesora del Departamento de Procesos y Tecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. Doctorado en Ciencias Bioquímicas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel I). Su línea de investigación se centra en el estudio de las enzimas como biocatalizadores: búsqueda de nuevas enzimas con potencial aplicación industrial y desarrollo de procesos enzimáticos, ambos principalmente del área alimentaria. Colabora en la Red BIOCATTEM (Biocatálisis para las industrias alimentarias, técnicas y médicas). También participa en la licenciatura de Ingeniería Biológica y en el Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Unidad Cuajimalpa.

Dr. Humberto García Arellano

Profesor del Departamento de Ciencias Ambientales de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma. Doctorado en Ciencias Bioquímicas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel I). Su línea de investigación se centra en el desarrollo de biosensores enzimáticos y en la biocatálisis aplicada a las áreas ambiental y de alimentos. Colabora en la Red BIOCATTEM (Biocatálisis para las industrias alimentarias, técnicas y médicas). También participa en la licenciatura de Biología ambiental de la UAM Lerma y en el Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM Cuajimalpa.

Dra. Maribel Hernández Guerrero

Doctora en Ingeniería Química por la Universidad de New South Wales (Australia). Desde 2009 es profesora investigadora en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa de la licenciatura en Ingeniería Biológica y el Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería. Desarrolla proyectos del área de materiales con la línea de investigación de membranas porosas con estructura de panal de polímeros sintéticos y naturales de residuos renovables. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del CONACYT, México (Nivel I).

Dr. Rodolfo Quintero y Ramírez

Ingeniero químico por la UNAM. Maestro en Ingeniería Química por el MIT. Doctor en Ingeniería Bioquímica por la Universidad de Manchester. Profesor-Investigador de la UAM-Cuajimalpa. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel III). Ha recibido varias distinciones: Premio Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (1983), Doctorado Honoris Causa (UANL, 1993), Doctorado Honoris Causa (UAEM, 2012), Premio Universidad Nacional Área de Innovación Tecnológica y Diseño Industrial (1994), se creó la Cátedra “Dr. Rodolfo Quintero Ramírez” en la UAM-Cuajimalpa (2011) y se instituyó el Premio “Rodolfo Quintero Ramírez” a la mejor tesis doctoral del Programa de Posgrado de la UNIDA, ITV.

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Es investigador Titular en el Departamento de Ingeniería Celular y Biotransformación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Su trabajo de investigación se relaciona al estudio de la fisiología microbiana y a la aplicación de la ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo de nuevas tecnologías biológicas. Es miembro regular de la Academia mexicana de Ciencias a partir de 2004 y miembro del consejo editorial de la revista “Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology” a partir de 2005. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1992, siendo actualmente nivel III.

Dra. Nohra E. Beltrán Vargas

Ingeniera biomédica, con estudios de maestría y Doctorado en Ingeniería Biomédica. Se incorporó a la UAM Cuajimalpa en septiembre del 2010 como profesora visitante y actualmente es profesora Titular C por tiempo indeterminado. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores Nivel I. Es representante del Cuerpo Académico de Fisiología Celular y Tisular de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM - C. Ha trabajado en proyectos de investigación de desarrollo de equipo médico innovador y en validaciones clínicas por más de 15 años. Trabajó del 2002 al 2010 en la empresa Innovamédica como Sub-directora de Investigación y Desarrollo. Trabajó en el Center of Biotechnology, University of Pittsburgh, PA. USA, en el Laboratorio de Organos Artificiales (1999). Sus intereses en investigación son la fisiopatología celular y tisular, cultivos celulares e ingeniería de tejidos, biomateriales aplicados a la medicina, biomarcadores de isquemia, y el daño de la mucosa gástrica. Ganadora del premio Intel 2008 por un desarrollo tecnológico innovador.

Dr. Mario García Lorenzana

Realizó sus estudios de licenciatura en Biología experimental, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa; Maestría en ciencias de la computación (educación), Fundación Arturo Rosenbluth con mención honorífica; Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, medalla al mérito universitario. Director de la Escuela de Biología de la Universidad Simón Bolívar (1984-1992). Actualmente Profesor Titular C de tiempo completo en Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Depto. de Biología de la Reproducción, Área de neurociencias. Profesor con Perfil PROMEP y forma parte del cuerpo académico Psicofarmacología conductual. Miembro del sistema nacional de investigadores nivel I. Línea de investigación: Regulación Neuroinmunoendócrina Tisular. Tiene amplia experiencia en análisis histológicos e inmunohistoquímicos.

Dr. Roberto Olivares Hernández

Ingeniero químico egresado de la UAM-I. Maestro en Ciencias (ingeniería química) por la UAM-I. Doctor en Biociencias por la Universidad Técnica de Chalmers. Su trabajo de investigación se centra en el diseño y simulación de la ingeniería de procesos, desarrollo de herramientas computacionales en biología de sistemas, biología sintética e Ingeniería metabólica. Actualmente es Profesor Asociado D adscrito al Departamento de Proceso y Tecnología. Perteneció al Sistema Nacional de Investigadores Nivel I. Participa en la licenciatura de Ingeniería Biológica y en el Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Unidad Cuajimalpa.

Dr. Raul Muñoz Torre

Es Ingeniero químico por la Universidad de Valladolid (2001) y Doctor en Biotecnología Ambiental por la Universidad de Lund (2005). Actualmente es profesor contratado doctor permanente en la Universidad de Valladolid. Su investigación se centra en tratamiento de aguas residuales con microalgas y tratamiento biológico de gases.

Dra. Adela Irmene Ortíz López

Ingeniera química por la Universidad Veracruzana-Xalapa. Maestra y Doctora en Ingeniería Química por la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Especialización en el Instituto Nacional de Recursos Naturales y Medio Ambiente (NIRE), en Japón. Estancias doctorales en Francia, en la Universidad de Montpellier II y en el Instituto Nacional de la Investigación en Agronomía (INRA), en Marsella. Sus investigaciones se relacionan con la Biotecnología Ambiental para la Eliminación de Compuestos Orgánicos en Aire y Suelos. Profesor Titular en la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa desde 2006. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel I.

Dr. Juan Gabriel Viguera Ramírez

Es Técnico Académico Titular “E” de tiempo completo del Departamento de Procesos y Tecnología. Estudió la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica Industrial y Posgrado en Biotecnología en la Universidad Autónoma Metropolitana. Realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidade Estadual de Campinas en Brasil. Fue becario en Samsung Electronics y colaborador en el área de control de calidad en la farmacéutica transnacional Lundbeck empresa especialista en medicamentos para el sistema nervioso. Actualmente realiza investigación en Biotecnología Ambiental, enfocado en los temas de “Biodegradación de sustratos gaseosos en biofiltros fúngicos”, “Recuperación de biomoléculas de alto valor agregado a partir de procesos de tratamiento de contaminantes” y “Ablandamiento de residuos lignocelulósicos usando hongos filamentosos”. Está encargado del manejo y capacitación en los equipos analíticos del laboratorio de cromatografía.

Dr. Juan Carlos Sigala Alanis.

Egresado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), realizó el Doctorado en Ciencias en el Instituto de Biotecnología de la misma Universidad bajo la dirección del Dr. Francisco Bolívar Zapata. Cuenta con dos estancias posdoctorales, una realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (2009) y otra en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania (2010). Se incorporó a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa como profesor visitante, y desde noviembre de 2014 es profesor Titular C por tiempo indeterminado. El Dr. Sigala ha estado involucrado en proyectos biotecnológicos que incluyen la caracterización fisiológica, el diseño y modificación genética de microorganismos para establecer las mejores condiciones de crecimiento y producción de metabolitos y biomoléculas. Tiene interés también en el estudio del metabolismo a través de técnicas de biología de sistemas. Sus líneas de investigación actuales consideran tópicos en fisiología microbiana, ingeniería metabólica en bacterias y caracterización de microorganismos por análisis genómicos, de transcripción y de flujos metabólicos. Cuenta con 15 artículos científicos en revistas internacionales arbitradas, un artículo y un capítulo de divulgación a nivel nacional, y ha sido tutor de cuatro tesis de licenciatura, 3 de maestría y 1 de especialización. Ha presentado 15 trabajos en congresos especializados nacionales e internacionales, ha dirigido 8 proyectos terminales y ha sido responsable de 5 servicios sociales. Finalmente, ha impartido diversos cursos a nivel licenciatura y posgrado en la UAM Cuajimalpa, y antes en la Facultad de Química de la UNAM y en el ITESM campus Cd. de México.

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria

La Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II (2017-2020). Tiene más de 40 publicaciones en revistas indexadas y capítulos de libro, 35 publicaciones en Proceedings y 52 participaciones en eventos y congresos en los últimos cinco años. Ha dirigido a 15 alumnos de posgrado, 10 de licenciatura y 20 Servicios Sociales, y adicionalmente asesorado a 7 alumnos a nivel Posgrado. La Dra. Morales es egresada de la Universidad Veracruzana de la licenciatura de Ingeniería Química, realizó sus estudios de maestría y doctorado en la misma disciplina en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, posteriormente hizo una estancia posdoctoral en la Universidad de California Campus Riverside, bajo el programa UC-Mexus. Trabajó en el Instituto Mexicano del Petróleo (2000-2005) como investigadora científica y desde el año 2005 es profesora-investigadora en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. Dentro de los cargos de gestión fue la primera coordinadora de la Licenciatura en Ingeniería Biológica (2008-2011) y Coordinadora del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería (2014-2015), actualmente es Jefa de Departamento de Procesos y

Tecnología (DPT) de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI). Ha pertenecido, durante varios periodos a la Comisión Dictaminadora Divisional y fungido como representante de profesor del DPT ante Consejo de la DCNI, miembro de consejos Editoriales de la DCNI y de la Unidad Cuajimalpa, entre otros. Perteneció al Cuerpo Académico de Biosistemas en Medio Ambiente y Energía. Su interés en investigación versa sobre tratamiento biológico de corrientes gaseosas contaminadas, gases de combustión y de efecto invernadero específicamente en la captura de CO₂ con microalgas para la obtención de biocombustibles o compuestos de valor agregado. Es Miembro del Comité Editorial temático de la revista *Cymbella* (Revista de la Sociedad de Ficología) y de Comité Científico de la Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (RELBA) y también es revisora en Publicaciones de alto impacto como PLOS one, Bioresource Technology, Chemosphere, entre otras. Ha sido responsable institucional de proyectos del Programa de Estímulos a la Innovación de CONACyT con empresas y actualmente del Centro de Innovación en Bioenergía en el clúster de Biocombustibles gaseosos del Fondo de Sustentabilidad Energética CONACyT-SENER además de un proyecto de Problema Nacionales.

Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero

Ingeniero bioquímico industrial y Doctor en biotecnología por la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Realizó estudios de posdoctorado en la misma institución. Trabaja en el modelamiento de la transferencia de calor y masa en bioprocesos de fermentación en medio sólido y en el mejoramiento y rediseño de reactores estáticos y agitados para tal propósito. Ha trabajado con el aprovechamiento de residuos orgánicos agroindustriales desde hace 17 años. Tiene tres publicaciones internacionales en revistas indexadas, una patente, un capítulo de libro y trece participaciones en congresos nacionales e internacionales especializados. Ha sido profesor en la licenciatura en Ingeniería Bioquímica Industrial de la UAM-I. En la actualidad es Profesor-Investigador Titular B de la licenciatura en Ingeniería Biológica del Departamento de Procesos y Tecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel Candidato).

Dra. Izlia Jazheel Arroyo Maya

Es Profesora Visitante Titular “C” de Tiempo Completo del Departamento de Procesos y Tecnología, perteneciente a la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. Estudió la Licenciatura en Ingeniería Bioquímica con la Especialidad de Alimentos en el Instituto Tecnológico de Morelia, Michoacán. La tesis de Licenciatura la desarrolló en el Área de Neurociencias y Terapéutica experimental en el CINVESTAV-IPN. La Maestría y Doctorado en Ciencias en Alimentos en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Realizó una estancia de investigación en el Laboratorio de tecnologías no térmicas para el procesamiento de alimentos en la Universidad de Washington, en 2011. Entre 2012 y 2015 realizó dos estancias posdoctorales, la primera en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y, la segunda en el Laboratorio de Biopolímeros y Coloides del Departamento de Ciencia en Alimentos de la Universidad de Massachusetts. La Dra. Arroyo cuenta con reconocimiento del SNI como Candidata a Investigadora Nacional. Cuenta con diversos artículos publicados en revistas indexadas y 2 capítulos de libro, así como varios trabajos presentados en eventos especializados nacionales e internacionales.

La Dra. Arroyo desarrolla investigación en el área de Nanotecnología y Alimentos funcionales en las líneas de: Diseño y caracterización de partículas biopoliméricas y materiales de origen biológico. Desarrollo de alimentos funcionales con impacto en la salud, sistemas de liberación oral y digestibilidad de nutrientes y nutraceuticos. Bionanotecnología. Estudio de polímeros y coloides derivados de biomoléculas

Dr. Álvaro Raúl Lara Rodríguez

Ingeniero bioquímico por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Doctor en Ciencias por el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Intereses de investigación: Ingeniería biológica, ingeniería bioquímica, biomanufactura biomanufactura.

Mtro. Miguel Sergio Hernández Jiménez

Egresado de la licenciatura en Ingeniería Bioquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana. Posteriormente, realizó sus estudios de maestría en Ingeniería Química en esta misma casa de estudios. Actualmente es candidato a Dr. en Biotecnología. Ha realizado estancias de investigación, en el Centro de Investigaciones de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia, en la Unidad 180 del Institut de Recherche pour le Développement (IRD), en la Universidad de Provence en Marseille, Francia y más recientemente en la Universidad Católica de Temuco.

El Mtro. Sergio Hernández ha sido Profesor Asociado de tiempo parcial en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa (UAM-I) y también fue Profesor Asociado en el Departamento de Enseñanza Experimental, y al área de Ingeniería Química del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Fungió como asistente de investigación de tiempo completo en la planta piloto de bioprocesos del área de Ing. Química de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y a partir del año 2000 es académico de la UAM. Fue Técnico Académico Titular “E” del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa. El Mtro. Hernández también fue coordinador de laboratorios de docencia e investigación, del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa. Actualmente es Técnico Académico Titular “E” del Departamento de Procesos y Tecnología y Coordinador de los Laboratorios de Docencia de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería en la UAM –Cuajimalpa. El Mtro. Sergio Hernández también se ha desempeñado como Ingeniero de Operaciones en el arranque y operación del sistema BIOCYDMR, en la compañía POLICYD, S.A. de C.V.

Desde 1997 trabaja en el área de biotecnología ambiental, específicamente en el tratamiento biológico de aire contaminado y tiene como principales líneas de investigación: Tratamiento de efluentes gaseosos contaminados con Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) mediante biofiltración. Tratamiento de efluentes líquidos contaminados con metales pesados. Tratamiento de malos olores y contaminación de interiores con COVs. Bioprocesos con microorganismos Extremófilos. Biofiltración fúngica. Tratamientos térmicos de materiales lignocelulósicos mediante steam explosion y tratamiento de efluentes líquidos mediante electrofloculación. Ha publicado diversos artículos científicos en revistas nacionales e internacionales, es coautor de algunos libros: mycofactories Book (2011). Purificación; Sustentabilidad una visión multidisciplinaria (2016) y usos del biogás (2017)

ALUMNOS

Angélica Reyes Lastiri

Estudió la licenciatura en Ingeniería Biológica en la Universidad Autónoma Metropolitana, Cuajimalpa y actualmente se encuentra realizando sus estudios de maestría en el Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería, Cuajimalpa. Se ha especializado en el diseño y validación de biorreactores aplicados en ingeniería de tejidos.

M. C. Eduardo Peña Mercado.

Estudió la licenciatura en Biología Experimental en la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa; y la maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería en la UAM Cuajimalpa. Actualmente se encuentra realizando sus estudios de doctorado en la misma Unidad. Tiene experiencia en análisis histológicos, realización de inmunohistoquímicas, Western Blot y RT-PCR. Se ha enfocado en el estudio de marcadores a nivel celular y molecular de daño de la mucosa gástrica a diferentes tiempos de isquemia. Su correo es: edbioexp@gmail.com

Problemas de ingeniería biológica (versión digital) se realizó en la Ciudad de México en septiembre de 2018. La producción editorial e impresión estuvo a cargo de Literatura y Alternativas en Servicios Editoriales S. C. Avenida Universidad 1815-c, Depto. 205, Colonia Oxtopulco, C. P. 04318, Delegación Coyoacán, Ciudad de México. En su composición se usaron tipos Minion Pro y Avenir. Se tiraron 100 ejemplares sobre papel Prisma Bright, papel certificado FSC (Forest Stewardship Council®)

Ref EP.01.00028.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa