

PROCESSOS BIOTECNOLÒGICS

Apunts de Classe

Màster en Enginyeria Química

Josep M. Penya-roja i Oltra

Material docent **revisat pel Servei de Llengües i de Política Lingüística**
de la Universitat de València - Estudi General

ÍNDIX

TEMA 1. PROCESSOS BIOTECNOLÒGICS: INTRODUCCIÓ

TEMA 2. TRANSFERÈNCIA DE MATÈRIA EN BIOREACTORS

TEMA 3. ESTERILITZACIÓ

TEMA 4. CANVI D'ESCALA EN BIOREACTORS

BIBLIOGRAFIA

ESTUDI DE LA TRANSFERÈNCIA D'OXIGEN EN UN BIOREACTOR

COL·LECCIÓ D'EXERCICIS PRÀCTICS

TEMA 1

PROCESSOS BIOTECNOLÒGICS: INTRODUCCIÓ

1.1	Microbiologia Industrial: el cas de la penicil·lina	2
1.2	Context històric i socioeconòmic.....	3
1.3	Principals sectors industrials amb processos biotecnològics	9
1.4	Biorefineria	11
1.5	Dissenys avançats en bioreactors.....	13
1.5.1	Augment de la velocitat volumètrica de producció	13
1.5.2	Reducció dels costos del procés	18
1.5.3	Reducció dels costos de separació del producte.....	19

1.1 MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL: EL CAS DE LA PENICIL·LINA

La penicil·lina és un antibiòtic que no solament ha representat un punt d'inflexió en la història de la medicina, també en la de la biotecnologia industrial. Per fer possible que la penicil·lina estiguera a l'abast de la població en general va ser necessària tota una cadena d'esdeveniments que va combinar el treball dur amb una sèrie de cops de bona sort.

En setembre de 1928, A. Fleming està treballant en el seu laboratori de St. Mary's Hospital en Londres. Tracta d'isolar un bacteri que fa créixer en superfície amb un medi nutrient, però es produeix una contaminació per una partícula desconeguda. Normalment, l'experiment hauria sigut descartat i s'hauria començat de nou. Però Fleming observa el cultiu i veu que els bacteris no són capaços de créixer prop del material contaminant i postula la hipòtesi de l'existència d'un agent bactericida. Així, un colp de sort, unit a la genialitat del científic, converteix un "experiment fallit" en un descobriment d'importància descomunal. Però encara queda un camí llarg perquè la penicil·lina pugui usar-se per al tractament d'infeccions bacterianes a escala mundial; de fet, els resultats van restar pràcticament en l'oblit durant més d'una dècada.

La imminència de la Segona Guerra Mundial va impulsar desesperadament les necessitats d'antibiòtics més efectius i amb menys efectes secundaris (fins al moment s'empraven les sulfamides, amb un espectre d'actuació molt limitat), de forma que els investigadors H. Florey i E. Chain, de la Universitat d'Oxford, van reprendre els experiments de Fleming per a provar-ne la idoneïtat. En aquesta etapa de recerca a escala de laboratori va ser clau la col·laboració de N. Heatley, qui va desenvolupar les tècniques per a la producció i extracció de prou quantitat de penicil·lina per a dur a terme els primers estudis clínics. Cap a la primavera de 1941 es va poder obtenir una quantitat suficient per a fer les primeres proves clíniques amb pacients humans. Els resultats van mostrar l'efectivitat de la penicil·lina sense cap mena de dubte. Però per a obtenir grans quantitats d'antibiòtic calia un procés industrial i per a desenvolupar tal procés, caldrien equips multidisciplinaris poc comuns fins al moment: enginyers, microbiòlegs i altres especialistes en biologia.

L'adversa situació del Regne Unit durant la guerra va fer que Florey i els seus col·laboradors hagueren de buscar ajut en la indústria farmacèutica dels Estats Units (Merck, Squibb, Pfizer,...). En primer lloc els esforços es van dirigir cap a la síntesi química de la penicil·lina: les grans farmacèutiques no creien que fora possible (o viable) una producció industrial mitjançant fermentació. Quan les dificultats de la via sintètica es feren evidents, A.L. Elder va ser designat per la indústria per a coordinar la possibilitat d'una via bioquímica. En referència a aquesta època, Elder recorda: "Em van ridiculitzar alguns dels meus amics científics més propers per involucrar-me en una tasca que òbviament estava destinada al fracàs: la producció a escala industrial de penicil·lina mitjançant un procés de fermentació." Contràriament a les hipòtesis inicials, la síntesi química de la penicil·lina no va ser possible fins a la dècada de 1950 i encara no ha pogut mostrar-se competitiva a dia d'avui.

Per al desenvolupament del procés biotecnològic, va ser necessària una intensa tasca de laboratori per tal d'augmentar el rendiment de la bioreacció. En aquest aspecte es va treballar des de diferents laboratoris envers diversos fronts, sobretot en l'obtenció de soques més productives (mutació i selecció) i l'optimització de l'aliment de fermentació (tipus de substrats, presència de precursors, etc.). Per altra banda, per un escalat exitós de la fermentació va resultar clau vèncer les reticències a canviar l'enfocament de laboratori (cultiu superficial) per un nou sistema de cultiu submergit en suspensió –del qual eren més partidaris els enginyers. El cultiu en suspensió presentava una sèrie de problemes operatius que van haver-se de vèncer: tant en referència a la fisiologia del fong com al mateix disseny

i operació del bioreactor. Per altra banda, també es presentaven reptes de complexitat similar relacionats amb la recuperació i purificació del producte a escala industrial.

Per al procés a escala industrial, es va fer necessari el subministrament de grans volums d'aire totalment net, sense oli ni partícules de pols, i estèril. També calia l'operació d'agitadors de gran potència amb segellat mecànic de l'eix, tenint en compte que la contaminació microbiològica podria degradar el producte, consumir els nutrients o desenvolupar toxines en el fermentador. Fins i tot avui dia, els problemes de transferència de matèria associats al subministrament d'oxigen i els problemes de transferència d'energia són restriccions importants per al disseny de fermentacions industrials.

Finalment, la farmacèutica Pfizer va ser la primera a posar a punt una planta comercial amb 14 bioreactors de 26,5 m³ (7000 galons) cadascun en març de 1944. Molt poc després, les altres grans companyies ja tenien enllestides les seues instal·lacions. Aquesta fita històrica va requerir un alt nivell de treball multidisciplinari. En aquest sentit, Merck va constatar una manca de disponibilitat de personal d'alt nivell amb formació combinada en enginyeria i en bioquímica. Així, la multinacional va decidir assignar una parella d'experts (en enginyeria química i microbiologia) per a abordar cada aspecte del problema, de forma que dissenyaven, executaven i analitzaven els projectes conjuntament com si es tractara d'una única persona. D'aquesta forma, es pot dir que va nàixer el concepte d'enginyeria bioquímica o de bioprocessos. Abans de la penicil·lina pràcticament no hi havia enginyers químics amb formació biològica o bioquímica. Així, el procés de la penicil·lina també va establir un paradigma per al desenvolupament de bioprocessos i de l'enginyeria bioquímica que encara guia la forma de pensar d'aquesta disciplina.

1.2 CONTEXT HISTÒRIC I SOCIOECONÒMIC

La biotecnologia és un camp en fase de ràpida expansió que, a més dels sectors industrials tradicionalment lligats a processos bioquímics (alimentació, indústria farmacèutica, tecnologia ambiental, etc.), està en procés de consolidar-se com una nova via, ambientalment sostenible, capaç de proporcionar alternatives comercialment viables a les tecnologies químiques convencionals. Tanmateix, la importància de la biotecnologia en la història de la humanitat és tal que fins i tot coincideix sincrònicament l'ús de processos biotecnològics (fabricació de cervesa) i el naixement de la civilització amb la revolució neolítica al voltant de 7000-6000 aC. Fins i tot hi ha historiadors que postulen una relació causa-efecte entre tots dos esdeveniments sota la hipòtesi que per a fer possible l'existència de ciutats estables cal un sistema de desinfecció de l'aigua de boca, i la presència d'etanol en baixes concentracions podria fer aquesta funció. En qualsevol cas, al llarg de 8.000 anys els microorganismes han anat proporcionant aliments (pa, iogurt, formatge, vinagre, cervesa...) abans que se'n coneguera l'existència mateixa, però sempre sota condicions autosuficients, és a dir, el medi de cultiu natural era l'adient per a la fermentació d'interès i desfavorable per a microorganismes competidors.

La invenció del microscopi en el segle XVII va fer possible l'observació de microorganismes per primera vegada. Malgrat això, la magnitud del descobriment no va ser apreciada fins molt més tard, quan es va rebutjar la teoria de la generació espontània a partir de l'experimentació desenvolupada per Louis Pasteur a mitjan segle XIX. Pasteur, entre altres descobriments, va demostrar que les fermentacions eren causades pel creixement de microorganismes. Posteriorment, E. Buchner encara va anar més enllà en descobrir en 1897 que era possible la fermentació en absència de cèl·lules vives en demostrar que una fermentació com l'alcohòlica es fonamenta en l'acció d'uns catalitzadors (enzims) i no a la

simple acció fisiològica de les cèl·lules del llevat. Així, la biotecnologia va passar d'una fase purament empírica a una de científica que va permetre els avenços tecnològics que es produïrien al llarg del segle XX.

En aquesta primera etapa científica es va produir un nou enfocament en els bioprocessos tradicionals per tal de potenciar l'obtenció de productes d'ús industrial: etanol, acetat, lactat, glicerol (cultius en suspensió) i enzims fúngics (cultius de superfície). Malgrat tot, en aquest etapa els bioprocessos encara es limitaven a aquelles reaccions de les quals no calia controlar el medi de reacció ni l'asèpsia del sistema.

Taula 1.1. Etapes del desenvolupament cronològic de la indústria biotecnològica.

Stage	Main Products	Vessels	Process Control	Culture Method	Quality Control	Pilot Plant Facilities	Strain Selection
1 Pre-1900	Alcohol Vinegar	Wooden, up to 1500 barrels capacity Copper used in later breweries Barrels, shallow trays, trickle filters	Use of thermometer, hydrometer and heat exchangers	Batch Batch	Virtually nil Virtually nil	Nil Nil	Pure yeast cultures used at the Carlsberg brewery (1886) Fermentations inoculated with 'good' vinegar Pure cultures used
2 1900–1940	Bakers' yeast glycerol, citric acid, lactic acid and acetone/butanol	Steel vessels of up to 200 m ³ for acetone/butanol Air spargers used for bakers' yeast Mechanical stirring used in small vessels	pH electrodes with off-line control Temperature control	Batch and fed-batch systems	Virtually nil	Virtually nil	Pure cultures used
3 1940–date	Penicillin, streptomycin, other antibiotics, gibberellin, amino acids, nucleotides, transformations, enzymes	Mechanically aerated vessels, operated aseptically—true fermenters	Sterilizable pH and oxygen electrodes. Use of control loops which were later computerized	Batch and fed-batch common Continuous culture introduced for brewing and some primary metabolites	Very important	Becomes common	Mutation and selection programmes essential
4 1964–date	Single-cell protein using hydrocarbon and other feedstocks	Pressure cycle and pressure jet vessels developed to overcome gas and heat exchange problems	Use of computer linked control loops	Continuous culture with medium recycle	Very important	Very important	Genetic engineering of producer strains attempted
5 1982–date	Production of heterologous proteins by microbial and animal cells Monoclonal antibodies produced by animal cells	Fermenters developed in stages 3 and 4. Animal cell reactors developed	Control and sensors developed in stages 3 and 4	Batch, fed-batch or continuous Continuous perfusion developed for animal cell processes	Very important	Very important	Introduction of foreign genes into microbial and animal cell hosts. In vitro recombinant DNA techniques used in the improvement of stage 3 products
6 2000–date	Use of "synthetic biology" to improve established fermentations and develop new bulk chemical processes	Fermenters developed in stages 3 and 4	Control and sensors developed in stages 3 and 4	Batch, fed-batch or continuous	Very important	Very important	Synthetic biology used to develop existing and novel fermentations

(P.F. Stanbury i Col. *Principles of Fermentation Technology*)

Com a conseqüència de les necessitats bèl·liques generades per la Primera Guerra Mundial es va produir un nou desenvolupament de la biotecnologia industrial. Per una banda, Alemanya tenia limitacions d'abastiment d'olis i greixos que s'empraven per a l'obtenció de glicerol, matèria bàsica per a la fabricació d'explosius. Aquesta conjuntura va forçar el desenvolupament d'un bioprocés industrial *ad hoc* per a solucionar el problema: a partir de les observacions de Pasteur sobre la formació de glicerol com a subproducte de la

fermentació alcohòlica, el científic alemany C. Neuberg va ser capaç de potenciar la generació de glicerol en la bioreacció mitjançant l'addició de bisulfit sòdic. Lògicament, aquest procés va deixar d'emprar-se en finalitzar la guerra ja que l'obtenció de glicerol a partir de greixos sempre resulta molt més econòmica. Per altra banda, la guerra va deixar el Regne Unit amb un abastiment insuficient d'acetona, dissolvent clau per a l'obtenció de la cordita (utilitzada per a la fabricació de municions). En aquest cas va ser el científic de la Universitat de Manchester C. Weizmann qui, a partir d'uns estudis inicials de Pasteur, va ser capaç de desenvolupar la fermentació ABE (acetona-butanol-etanol) a partir d'un substrat orgànic de carbohidrats fent servir una població de *Clostridium acetobutylicum*. Aquest bioprocés va representar un nou salt qualitatiu en l'evolució de la biotecnologia, donat que va ser el primer procés que no era autoregulat. Les condicions de treball i el medi ric en nutrients fomentaven el desenvolupament d'altres organismes. Així, per primera volta, l'equipament s'havia dissenyat per treballar sota condicions d'asèpsia total i amb un control de les condicions d'operació per tal d'aconseguir un bon rendiment. Es tracta d'una gran revolució en la història de la biotecnologia: per primera volta es desenvolupava un procés que no seria viable de forma natural tot partint d'una base científica. Aquest procés ha tornat a cobrar interès avui dia per tal d'obtenir productes d'origen renovable en substitució dels combustibles fòssils.

Un punt d'inflexió d'importància cabdal en el desenvolupament de bioprocessos va ser la producció, recuperació i purificació de la penicil·lina a escala industrial durant la Segona Guerra Mundial. Tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior, aquest procés va introduir un nou nivell de complexitat en tractar-se d'un sistema aerobi en condicions asèptiques. La recuperació de l'antibiòtic també va suposar un repte important. Tot plegat va mostrar, per primera volta en la història, la importància de combinar els coneixements d'enginyeria amb els de microbiologia per a afrontar el futur biotecnològic que, com s'està demostrant en l'actualitat, cobraria cada volta més importància en la indústria de processos.

A finals de la dècada de 1950 van començar a utilitzar-se directament els enzims com a biocatalitzadors. Inicialment es van emprar enzims extracel·lulars, com les amilases i proteases, per a la hidròlisi de midó i proteïnes, respectivament. Molt prompte es va aconseguir fer servir enzims intracel·lulars; el primer a fer-se servir comercialment va ser la xilosa isomerasa (també coneguda com glucosa isomerasa), utilitzada per a la transformació de glucosa en fructosa en la indústria alimentària.

El següent salt qualitatiu en el desenvolupament de la biotecnologia industrial es va produir amb la introducció i optimització de sistemes de fermentació en continu. Abans de 1960, els bioprocessos eren quasi exclusivament en discontinu. Un exemple paradigmàtic va ser el desenvolupament del bioprocés per a l'obtenció de proteïnes per a l'alimentació humana i animal a partir de diferents fonts de carboni, entre elles els hidrocarburs. L'objectiu del procés era obtenir microorganismes unicel·lulars (SCP, *single-cell protein*) amb un alt contingut proteic a partir de cultius purs o mesclats d'algues, llevat, fongs o bacteris. Encara que aquest procés va representar tot un èxit tecnològic, la disponibilitat de proteïnes de preu molt baix al mercat va fer que no resultara econòmicament viable; no obstant això, va contribuir significativament a l'avenç del coneixement tècnic i científic dels bioprocessos industrials.

L'aparició de la tecnologia d'ADN recombinant al final de la dècada de 1970 va ampliar la gamma de possibles productes de fermentació, fet que va suposar una nova era en la biotecnologia. Els gens d'organismes superiors poden introduir-se en cèl·lules microbianes de tal manera que els receptors siguin capaços de sintetitzar proteïnes "estrangeres". Aquestes proteïnes s'anomenen heteròlogues, és a dir, "derivades d'un organisme diferent".

S'ha utilitzat diverses cèl·lules microbianes com a receptors d'aquests sistemes, com ara *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* i fongs filamentosos. Les cèl·lules animals cultivades en sistemes de fermentació també són àmpliament utilitzades per a la producció de proteïnes heteròlogues. No obstant això, encara queden per a resoldre diversos problemes associats als bioprocessos amb cèl·lules animals: són extremadament fràgils en comparació amb les cèl·lules microbianes, no es pot treballar amb concentracions elevades i els medis de fermentació necessaris són molt complexos. Entre els primers productes biotecnològics "recombinants" obtinguts cal destacar la insulina, obtinguda mitjançant modificació genètica aplicada al bacteri *Escherichia coli*. La insulina, com a primer producte "biofarmacèutic", va precipitar l'actual mercat farmacèutic basat en la tecnologia de l'ADN recombinant. Abans dels anys 1980, la insulina per al tractament de la diabetis s'obtenia a partir de pàncrees porcí o boví. No obstant això, l'ús continuat d'aquesta mena d'insulina podia provocar problemes en els pacients. Per altra banda, el preu era molt elevat: per a cobrir les necessitats anuals d'un pacient diabètic eren necessaris els pàncrees d'aproximadament 50 porcs. La Figura 1.1 mostra les etapes per a la comercialització d'un producte derivat d'ADN recombinant. Cal emfasitzar que aquesta tecnologia obri les portes al que s'anomena "biologia sintètica", és a dir, síntesi de biomolècules o enginyeria de sistemes biològics amb noves funcions que no es troben en la natura.

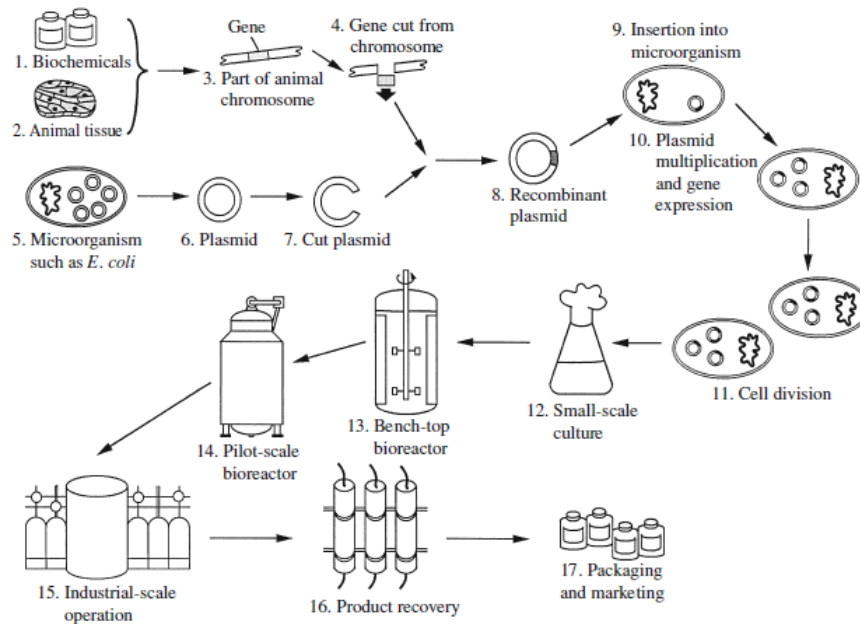


Figura 1.1. Etapes en el desenvolupament d'un bioprocés complet per a la fabricació a escala industrial d'un nou producte derivat d'ADN recombinant.

(P.M. Doran *Bioprocess engineering principles*)

Avui dia, en molts casos es prefereix la ruta biotecnològica a la química per a l'obtenció de segons quins productes. Les condicions dels bioprocessos són moderades i els biocatalitzadors molt específics, de forma que comparativament es genera una quantitat molt menor de subproductes; a més, els bioprocessos són més favorables des d'una òptica ambiental. Com mostra la Taula 1.2, els productes biotecnològics són presents arreu de les diverses indústries, incloent-hi especialment alimentació, farmacèutica, ambiental i, cada vegada més, la indústria de productes químics. Es podria dir que mai hi ha hagut un moment en el qual la formació d'un enginyer en el camp dels bioprocessos haja estat més indispensable per a fer realitat la promesa d'una futura biotecnologia.

Taula 1.2. Principals exemples de productes obtinguts per processos biotecnològics.

Product	Typical organism used
BIOMASS	
Agricult. inoculants for nitrogen fixation	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Bakers' yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Cheese starter cultures	<i>Lactococcus</i> spp.
Inoculants for silage production	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Single-cell protein	<i>Candida utilis</i> or <i>Pseudomonas methylotrophus</i>
Yoghurt starter cultures	<i>Streptococcus thermophilus</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
BULK ORGANICS	
Acetone/butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Ethanol (nonbeverage)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Glycerol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ORGANIC ACIDS	
Citric acid	<i>Aspergillus niger</i>
Gluconic acid	<i>Aspergillus niger</i>
Itaconic acid	<i>Aspergillus itaconicus</i>
Lactic acid	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
AMINO ACIDS	
L-Arginine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Glutamic acid	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L-Lysine	<i>Brevibacterium flavum</i>
L-Phenylalanine	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Others	<i>Corynebacterium</i> spp.
NUCLEIC ACID-RELATED COMPOUNDS	
5'-guanosine monophosphate (5'-GMP)	<i>Bacillus subtilis</i>
5'-inosine monophosphate (5'-IMP)	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>
ENZYMES	
α -Amylase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Glucoamylase	<i>Aspergillus niger</i>
Glucose isomerase	<i>Bacillus coagulans</i>
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>
Proteases	<i>Bacillus</i> spp.
Rennin	<i>Mucor miehei</i> or recombinant yeast
VITAMINS	
Cyanocobalamin (B12)	<i>Propionibacterium shermanii</i> or <i>Pseudomonas denitrificans</i>
Riboflavin (B2)	<i>Eremothecium ashbyii</i>
EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES	
Dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Xanthan gum	<i>Xanthomonas campestris</i>
Other	<i>Polianthes tuberosa</i> (plant cell culture)
POLY-β-HYDROXYALKANOATE POLYESTERS	
Poly- β -hydroxybutyrate	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
ANTIBIOTICS	
Cephalosporins	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Penicillins	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Aminoglycoside antibiotics (streptomycin)	<i>Streptomyces griseus</i>
Ansamycins (e.g., rifamycin)	<i>Nocardia mediterranei</i>

Aromatic antibiotics (e.g., griseofulvin)	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Macrolide antibiotics (e.g., erythromycin)	<i>Streptomyces erythreus</i>
Nucleoside antibiotics (e.g., puromycin)	<i>Streptomyces alboniger</i>
Polyene macrolide antibiotics (e.g., candidin)	<i>Streptomyces viridoflavus</i>
Polypeptide antibiotics (e.g., gramicidin)	<i>Bacillus brevis</i>
Tetracyclines (e.g., 7-chlortetracycline)	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
ALKALOIDS	
Ergot alkaloids	<i>Claviceps paspali</i>
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i> (plant cell culture)
SAPONINS	
Ginseng saponins	Panax ginseng (plant cell culture)
PIGMENTS	
β -Carotene	<i>Blakeslea trispora</i>
PLANT GROWTH REGULATORS	
Gibberellins	<i>Gibberella fujikuroi</i>
INSECTICIDES	
Bacterial spores	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungal spores	<i>Hirsutella thompsonii</i>
MICROBIAL TRANSFORMATIONS	
D-Sorbitol to L-sorbose (in vit. C Production)	Acetobacter suboxydans
Steroids	<i>Rhizopus arrhizus</i>
VACCINES	
Diphtheria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Hepatitis B	Surface antigen expressed in recombinant <i>S. cerevisiae</i>
Mumps	Attenuated viruses grown in chick embryo cell cultures
Pertussis (whooping cough)	<i>Bordetella pertussis</i>
Poliomyelitis virus	Attenuated viruses grown in monkey
Rubella	Attenuated viruses grown in baby hamster kidney cells
Tetanus	<i>Clostridium tetani</i>
THERAPEUTIC PROTEINS	
Erythropoietin	Recombinant mammalian cells
Factor VIII	Recombinant mammalian cells
Follicle-stimulating hormone	Recombinant mammalian cells
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Recombinant <i>Escherichia coli</i>
Growth hormones	Recombinant <i>Escherichia coli</i>
Hirudin	Recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Insulin and insulin analogues	Recombinant <i>Escherichia coli</i>
Interferons	Recombinant <i>Escherichia coli</i>
Interleukins	Recombinant <i>Escherichia coli</i>
Platelet-derived growth factor	Recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tissue plasminogen activator	Recombinant <i>Escherichia coli</i> or mammalian cells
MONOCLONAL ANTIBODIES	
Various, including Fab and Fab2 fragments	Hybridoma cells
THERAPEUTIC TISSUES AND CELLS	
Cartilage cells	Human (patient) chondrocytes
Skin	Human skin cells

(P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*)

1.3 PRINCIPALS SECTORS INDUSTRIALS AMB PROCESSOS BIOTECNOLÒGICS

Entre els principals sectors industrials que utilitzen processos bioquímics destaquen la indústria alimentària, farmacèutica, ambiental, l'obtenció d'enzims i la indústria química de base. Especialment en aquest darrer sector, la presència de processos biotecnològics augmenta exponencialment com a conseqüència de l'esgotament de recursos no renovables. Entre tots els sectors, la indústria alimentària és la més tradicional i que compta amb major volum de processos biotecnològics, que es poden classificar d'acord amb els seus objectius:

- Processos de síntesi de productes comestibles en la indústria làctica (formatges, iogurts), cervesera, vínica, panificadora, etc.
- Processos de síntesi de microorganismes: producció de llevat per a panificació, biomassa rica en proteïna per alimentació (SCP, *single-cell protein*), etc.
- Processos de síntesi d'additius alimentaris com ara acidificants (àcid làctic, glutàmic, cítric), espessidors i gelificants a partir de polisacàrids, etc. Amb freqüència, en funció de l'ús final, molts d'aquests productes (com els acidificants) es consideren productes químics de base, no necessàriament alimentaris.
- Processos de modificació directa d'aliments mitjançant addició d'enzims per a millorar sabor, valor nutritiu o característiques físiques.

Pel que fa a la indústria farmacèutica, els antibiòtics han tingut i continuen tenint una gran importància cabdal tant des del punt de vista clínic com comercial. Com s'ha exposat en la introducció del tema, la fabricació a escala industrial de la penicil·lina va suposar un punt d'inflexió en la història de la indústria de processos, que mostra de forma clara el futur que augura a la biotecnologia en el conjunt de la indústria. No obstant, tota una sèrie de productes d'alt valor afegit són objecte d'obtenció mitjançant fermentació (Taula 1.2), en molts casos com a conseqüència de l'augment del coneixement científic relacionat amb la manipulació a nivell molecular de l'ADN: vitamines (B12, riboflavina), vacunes (diftèria, rubèola, hepatitis B, etc.), proteïnes terapèutiques (insulina, hormona del creixement,...), etc.

Com es pot veure en la Taula 1.3, els enzims d'ús comercial més importants són les hidrolases (de midó, proteïnes i pectines), normalment en l'àmbit de l'alimentació i, particularment, en el processament del midó. Cal destacar la importància històrica de l'ús de la glucosa isomerasa per a l'obtenció de xarops de fructosa per a la indústria alimentària, en tractar-se del primer enzim intracel·lular que va poder utilitzar-se comercialment. Els enzims poden emprar-se tant com a productes cel·lulars immobilitzats o com a reactius lliures. En aquest darrer cas, si la producció de l'enzim és intracel·lular, caldrà procedir a l'alliberament mitjançant tècniques d'extracció, com el refredament, la trituració, ultrasons o sobrepressió.

En la indústria ambiental, els tractaments biològics solen constituir l'opció més favorable des del punt econòmic i ambiental, per l'eliminació de contaminants orgànics biodegradables tant de corrents d'aigua com d'aire. Així, com a exemple més representatiu, en estacions depuradores d'aigües residuals urbanes, el tractament biològic constitueix el nucli principal de la instal·lació. Els processos biològics de tractament consisteixen bàsicament en la posada en contacte del corrent contaminat amb una població de microorganismes que transformen la matèria orgànica biodegradable en material cel·lular i altres subproductes que poden ser separats fàcilment del corrent de fluid. Les aplicacions biotecnològiques ambientals es caracteritzen per treballar en bioreactors en continu i en un procés no estèril.

Taula 1.3. Algunes aplicacions industrial dels enzims.

Industry	Application	Enzyme	Source
Baking and milling	Reduction of dough viscosity, acceleration of fermentation, increase in loaf volume, improvement of crumb softness, and maintenance of freshness	Amylase	Fungal
	Improvement of dough texture, reduction of mixing time, increase in loaf volume	Protease	Fungal/bacterial
Brewing	Mashing	Amylase	Fungal/bacterial
	Chill proofing	Protease	Fungal/bacterial
Cereals	Improvement of fine filtration	β -Glucanase	Fungal/bacterial
	Precooked baby foods, breakfast foods	Amylase	Fungal
Chocolate and cocoa	Manufacture of syrups	Amylase	Fungal/bacterial
Coffee	Coffee bean fermentation	Pectinase	Fungal
	Preparation of coffee concentrates	Pectinase, hemicellulase	Fungal
Confectionery	Manufacture of soft center candies	Invertase, pectinase	Fungal/bacterial
Cotton	Low temperature processing	Pectate lyase	Fungal
Corn syrup	Manufacture of high-maltose syrups	Amylase	Fungal
	Production of low D.E. syrups	Amylase	Bacterial
	Production of glucose from corn syrup	Amyloglycosidase	Fungal
	Manufacture of fructose syrups	Glucose isomerase	Bacterial
Dairy	Manufacture of protein hydrolysates	Protease	Fungal/bacterial
	Stabilization of evaporated milk	Protease	Fungal
	Production of whole milk concentrates, ice cream, and frozen desserts	Lactase	Yeast
Eggs, dried	Curdling milk	Protease	Fungal/bacterial
	Glucose removal	Glucose oxidase	Fungal
Fruit juices	Clarification	Pectinases	Fungal
	Oxygen removal	Glucose oxidase	Fungal
Laundry	Detergents	Protease, lipase	Bacterial
Leather	Dehairing, baiting	Protease	Fungal/bacterial
Meat	Tenderization	Protease	Fungal
Paper	Removal of wood waxes	Lipase	Fungal
Pharmaceutical	Digestive aids	Amylase, protease	Fungal

(P.F. Stanbury i Col., *Principles of Fermentation Technology*)

Pel que fa a la indústria química de base, moltes substàncies orgàniques amb aplicacions industrials poden obtenir-se biològicament o per síntesi química. La decisió de triar una o altra opció es fonamenta principalment en la viabilitat econòmica, que dependrà fonamentalment de tres aspectes: cost de la matèria primera, rendiment del procés i cost de la recuperació del producte d'interès. En la síntesi química, la matèria primera és el petroli o els seus derivats, mentre que les fermentacions solen partir de sucres simples, com la glucosa, que s'obtenen a partir de la hidròlisi d'alguna font natural de polisacàrid. Així, la conjuntura econòmica tindrà una influència decisiva per a l'obtenció d'aquests productes orgànics: l'esgotament dels recursos fòssils, especialment el petroli, encareix l'opció de la

síntesi química i afavoreix el desplaçament de l'equilibri cap a l'opció biotecnològica, que en aquest cas està adquirint una gran importància quant a inversió de recursos econòmics, tal com s'explica en la següent secció.

1.4 BIOREFINERIA

Un dels punts clau en l'expansió exponencial de la revolució industrial va ser la disponibilitat de recursos fòssils, que podien ser emprats com a fonts barates d'energia i matèries primeres. A conseqüència d'això, la humanitat ha pogut assolir un nivell de vida alt que impossibilita la tornada arrere cap a una vida primitiva. No obstant això, l'esgotament dels recursos no renovables genera una necessitat imperiosa de canviar la indústria actual i l'enfocament de la civilització cap a un sistema sostenible que pugui assegurar que la nostra forma de vida continue millorant després de l'esgotament dels recursos fòssils. La forma de vida actual només podrà ser possible si la sostenibilitat es manté en un termini no superior a una generació.

El nou concepte de *biorefineria* s'utilitza per analogia a les refineries del petroli, fent referència a una estructura de processos que a partir de matèries primeres (en aquest cas biomassa lignocel·lulòsica en lloc de petroli) produeix combustibles, energia i productes químics. La biomassa lignocel·lulòsica és renovable, es genera a partir de l'energia solar i del diòxid de carboni i aigua del medi, i allibera oxigen. Per tant, la biorefineria està destinada a jugar un paper clau en possibilitar el cicle sostenible de la biomassa alhora que satisfà les necessitats humanes quant a energia i materials químics bàsics.

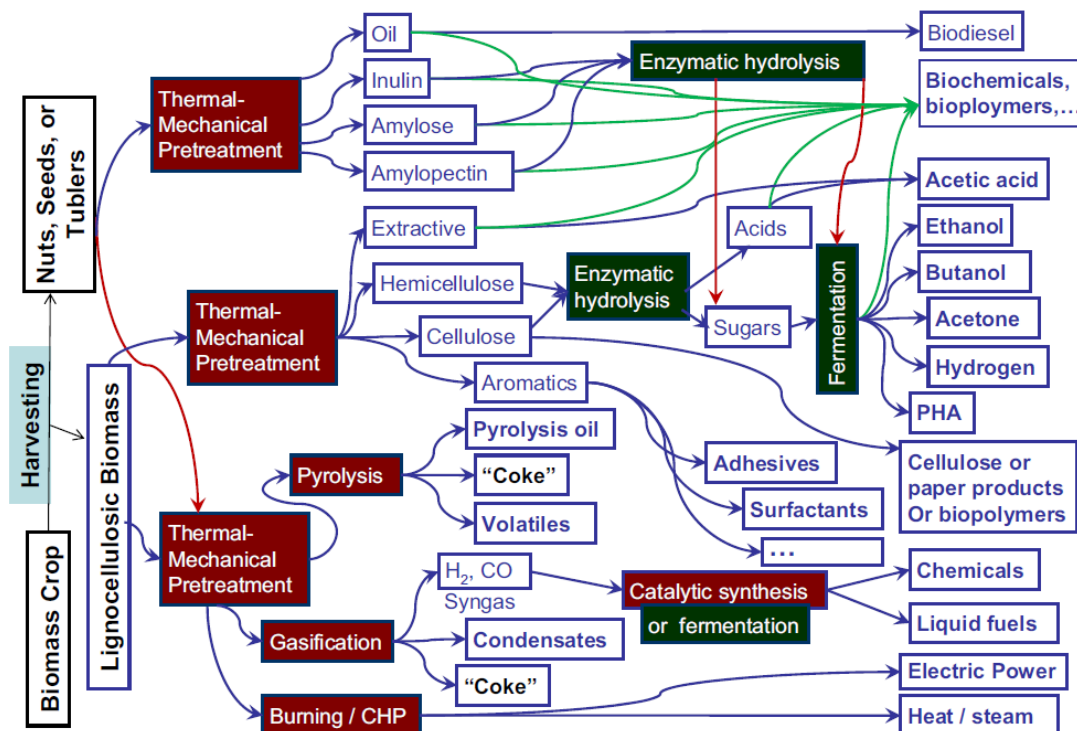


Figura 1.2. Esquema de diversos processos de biorefineria.
(S. Liu, *Bioprocess engineering*)

La biorefineria integra una gran varietat de processos de conversió de materials per tal d'obtenir múltiples corrents de productes, com combustibles, energia (calor i electricitat) i productes químics bàsics. Aquesta estructura de processos que constitueix la biorefineria s'ha identificat com la ruta més prometedora per a la consecució d'una economia sostenible. En produir múltiples productes, una biorefineria maximitza el valor derivat d'una matèria primera constituïda per biomassa lignocel·lulòsica, de forma que genera productes químics de gran valor afegit en baix volum, juntament amb combustibles de baix valor afegit en grans quantitats, mentre genera electricitat i calor per al seu propi ús i/o distribució.

La Figura 1.2 mostra un esquema de diversos processos de biorefineria. Hi ha dues categories o enfocaments principals en l'estructura de una biorefineria: processos bioquímics i processos termoquímics. En els processos bioquímics, la biomassa lignocel·lulòsica normalment s'hidrolitza en components individuals sistemàticament per a les conversions òptimes que tindran lloc en etapes posteriors. L'enfocament bàsic es basa en un desmuntatge sistemàtic i la conversió a productes químics desitjats. Els processos bioquímics depenen en gran mesura de la separació i/o fraccionament físic dels intermedis, així com dels productes finals desitjats. Es prefereixen conversions biològiques sobre conversions químiques a causa de la selectivitat que tenen. No obstant això, a causa de la complexitat de la biomassa lignocel·lulòsica, caldria una gran quantitat de processos biocatalitzats per a una operació òptima. A més, les bioreaccions poden ser en certa mesura lentes i necessitarien instal·lacions de grandàries considerables.

La piròlisi s'assembla més a un procés de refinaria clàssic, de manera que els productes es poden controlar d'una manera més sistemàtica. També es pot classificar com una descomposició sistemàtica. No obstant això, hi ha restriccions sobre el tipus de productes que el procés pot produir. La gasificació, tal i com es mostra en la Figura 1.2, descompon la biomassa lignocel·lulòsica als blocs bàsics, H_2 i CO , de forma que es poden obtenir els productes desitjats per síntesi catalítica o per fermentació. Per exemple, el procés Fischer-Tropsch pot convertir CO i H_2 en alcohols, alquens i molts altres productes. Per altra banda, el gas de síntesi (juntament amb aire: barreja de N_2 i O_2) és també el punt de partida per a la síntesi d'amoníac (procés Haber-Bosch), a partir del qual es produeixen els fertilitzants de nitrogen i molts altres productes. No obstant això, els processos termoquímics presenten baixa selectivitat. Durant el procés de descomposició es produeix carbó de coc, especialment a altes temperatures i, per tant, es redueix l'eficiència de conversió a H_2 i CO .

Els fonaments que permeten esperar que la biorefineria pugui arribar a cobrir les necessitats humanes de productes químics bàsics es mostren a la Figura 1.3. Cada fletxa que irradia de la glucosa, en el centre, representa una ruta de biotransformació (o fermentació) per defecte, mentre que les transformacions químiques es mostren amb fletxes etiquetades. Per exemple, la glucosa pot ser fermentada a etanol mitjançant llevat en condicions anaeròbies, i l'àcid làctic es pot produir mitjançant lactobacteris. Com a exemple de la via química, la glucosa es pot deshidratar catalíticament a 5-hidroximetilfurfural, que es pot descompondre addicionalment a l'àcid levulínic per hidratació. Tots aquests productes que es mostren en la Figura 1.3 són exemples de productes químics d'ús directe (o intermedis) importants o productes químics bàsics. Per exemple, l'etanol és ben conegut pel seu ús com a combustible líquid. Però també es pot deshidratar a etilè, que és el monòmer per a obtenir polietilè, o deshidrogenar i deshidratar per a fer el monòmer 1,3-butadiè, per a l'obtenció de la goma sintètica. Per altra banda, també es pot emprar etanol per a produir alcohols i alquens superiors.

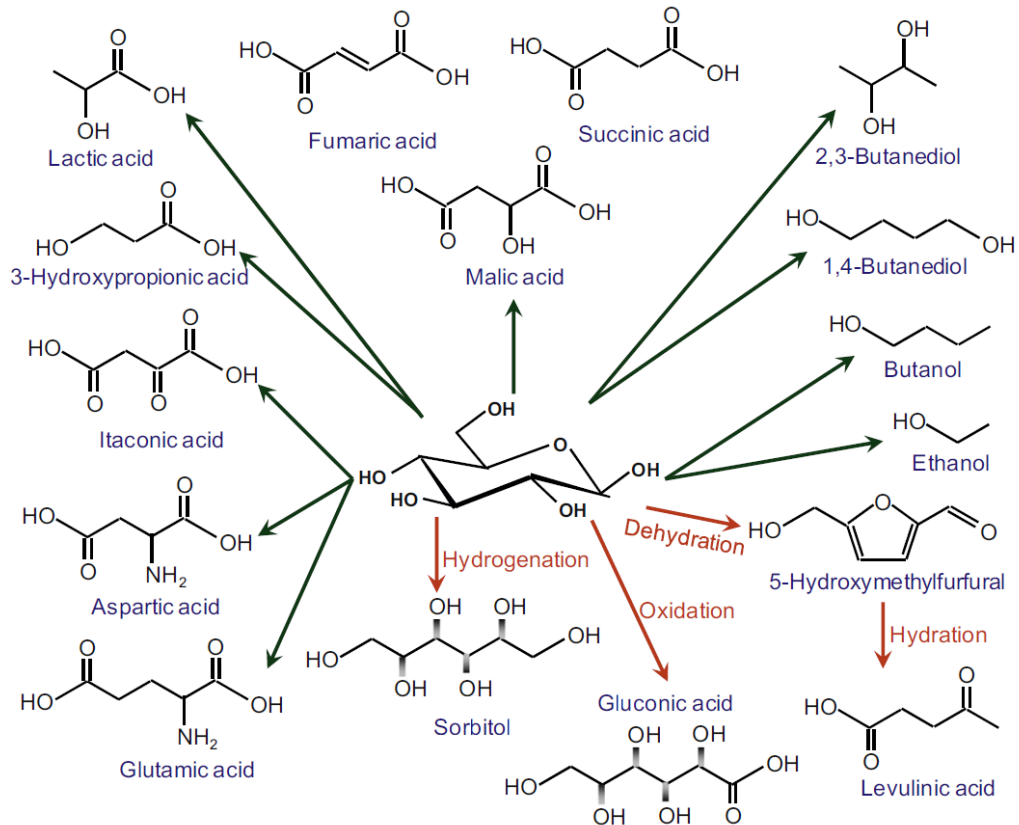


Figura 1.3. Alguns del productes químics bàsics derivats de la glucosa. La majoria obtinguts via fermentació, mentre que uns pocs provenen de transformacions químiques (reaccions etiquetades en la figura).

(S. Liu, *Bioprocess engineering*)

1.5 DISSENY AVANÇATS EN BIOREACTORS

Els dissenys avançats de bioreactors són modificacions als sistemes ideals que tenen com a finalitat proporcionar millors rendiments de cèl·lules i/o productes en condicions competitives, és a dir, que permeten minimitzar el cost de fabricació del producte. Per a aquesta finalitat es pot treballar en diferents direccions:

1. Maximitzar la velocitat volumètrica de producció.
2. Reduir costos del procés, per exemple, mà d'obra i consum energètic.
3. Simplificar i abaratir els processos de recuperació.

1.5.1 Augment de la velocitat volumètrica de producció

La velocitat de generació del producte d'interès es pot maximitzar de diferents formes:

A) Consideració de factors limitants del procés

Si hi ha una inhibició per substrat, es pot utilitzar un reactor continu de tanc agitat o un reactor discontinu de tanc agitat amb alimentació *fed-batch*. Si hi ha inhibició pel producte, és millor utilitzar reactors de flux de pistó, treballar amb una sèrie de bioreactors continus de tanc agitat o acoblar un sistema de separació *in situ* que permeta eliminar el producte a mesura que es va formant.

B) Maximitzant la concentració de biomassa en el bioreactor

Per a processos continus de cultiu en suspensió, la pràctica habitual per a treballar amb concentracions elevades de biomassa en el fermentador és la recirculació. En aquests equips s'empra en la majoria de sistemes l'autofloculació, que s'aconsegueix en fomentar la capacitat natural dels microorganismes de formar agregats cel·lulars de certa densitat. La floculació dependrà dels factors ambientals i de la hidrodinàmica del fermentador. Es pot afavorir mitjançant l'addició d'agents externs. La grandària del flòcul es pot controlar a partir de l'equilibri entre les forces d'adhesió i les de cisalla provocades pel fluid, sempre amb l'objectiu de controlar les resistències de la transferència de matèria en valors òptims.

Sistemes més eficaços, encara que menys implantats a escala industrial, són els sistemes d'immobilització. La concentració cel·lular es pot augmentar considerablement mitjançant l'ús de sistemes de retenció que possibiliten mantenir la biomassa activa a una densitat adequada evitant-ne l'arrossegament: fixació de la població en microportadors (plàstics, col·làgens), retenció per atrapament en matrius hidrocol·loïdals, microencapsulació o fixació de les cèl·lules en membranes semipermeables (Figura 1.4, producció d'anticòs monoclonal per cèl·lules de mamífers empaquetades a altes densitats cel·lulars, 10^9 cèl./ml, amb creixement negligible).

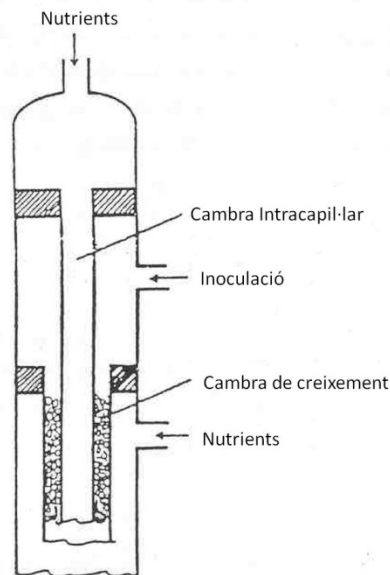


Figura 1.4. Bioreactor *Tricentric*. Fixació del biocatalitzador entre membranes semipermeables.

Els bioreactors de llit fix han de disposar d'un sistema de retenció del biocatalitzador per adhesió o inclusió. Hi ha diversos processos a escala industrial basats en el sistema de cultiu fix, sobretot per enzims immobilitzats (isomerització de la glucosa, separació de mescleres racèmiques d'aminoàcids, etc.). Aquesta configuració també s'està aplicant a processos fermentatius tradicionals. Per exemple, s'han fet assajos en fermentador multietapa de torre de 100 m^3 per a la producció d'etanol amb *S. Cerevisae* que disminueixen els costos energètics un 30%. En el camp de la biotecnologia ambiental destaquen els sistemes aerobis de biodiscs i filtres percoladors i el filtre anaerobi per al tractament d'aigües residuals i els biofiltres (o biofiltres percoladors) per a l'eliminació de compostos orgànics volàtils de corrents gasosos.

Els bioreactors de llit fix es poden utilitzar en dues configuracions bàsiques: flux de pistó o recirculació de la fase fluida. Els reactors de flux de pistó solen ser fàcils d'operar i presenten un control senzill. L'eficiència del sistema en aquests bioreactors està controlada per:

- La concentració cel·lular activa en l'equip.
- La velocitat de transferència de matèria, que serà funció de la velocitat lineal del fluid a través del llit, és a dir: serà convenient dissenyar el sistema amb elevades relacions L/D (longitud/diàmetre) per tal de reduir la retromescla. En qualsevol cas, hi haurà una limitació d'alçada del llit segons la pressió que pugui suportar el biocatalitzador.
- Factors de tipus operacional: retenció de gas, CO₂ (menor relació L/D, menor retenció), embossament per acumulació de sòlids (no se sol recomanar en cas de substrats amb partícules en suspensió), pèrdua de càrrega o control de temperatura.

A voltes, quan es treballa amb bioreactors de cultiu fix, convé ajustar la recirculació en diferents graus. La recirculació permet modificar la hidrodinàmica de flux i obtenir graus intermedis entre el flux de pistó i mescla completa, de forma que es poden regular gradients com ara el pH o la temperatura. Així, es pot disminuir la concentració de substrat en l'entrada del reactor, d'interès si es produeix inhibició pel substrat. Amb l'augment de la relació de recirculació també s'aconsegueix augmentar la velocitat lineal i, per tant, augmentar la velocitat de transferència de matèria i, en cas de un sistema aeròbic, millorar l'oxigenació.

Els bioreactors de llit fluïditzat poden constituir una alternativa interessant al llit fix. Es tracta de fermentadors en els quals es regula el cabal de fluid ascendent de forma que la pèrdua de càrrega del fluid en passar a través del llit de partícules de biocatalitzador es fa igual al pes per unitat d'àrea del llit i, en conseqüència, les partícules queden en suspensió sense pràcticament contacte entre elles. Així, s'aconsegueix una reducció significativa en la resistència a la transferència de matèria. Entre els avantatges del llit fluïditzat destaquen més facilitat en l'eliminació de gasos produïts, la possibilitat de treballar amb partícules més petites (més àrea de contacte) i la dificultat en l'embossament per creixement excessiu de biomassa (*clogging*).

El principal inconvenient dels sistemes de llit fluïditzat radica en la complexitat de la hidrodinàmica del bioreactor. Presenta un marge molt estret quant a la velocitat d'ascens i fa necessari un procés de posada en marxa llarg i complex. Aquest tipus de bioreactors s'ha emprat en nombroses aplicacions: producció de cervesa, bioetanol, cultiu de cèl·lules animals, tractament anaerobi d'aigua residual, etc.

Els equips de major aplicació industrial són els fermentadors de torre (Figura 1.5), que han estat desenvolupats a escala industrial per a l'operació amb llevats amb capacitat de flocular. Per exemple, en el procés APV per a la fabricació de cervesa és una torre d'elevada relació longitud/diàmetre ($L/D > 10$) amb un separador trifàsic (GLS, gas-líquid-sòlid) en la part superior. En la part inferior del cap de la torre hi ha una zona en repòs, lliure del gas ascendent, on sedimenten les partícules de biocatalitzador arrossegades pel corrent i retornen al bioreactor. En la part superior, l'augment de la secció disminueix la velocitat de circulació que provoca la coalescència de les bombolles de gas, cosa que facilita la ulterior separació. A voltes, els problemes relacionats amb la hidrodinàmica (mantenir les partícules en suspensió sense arrossegament i la fase líquida en circulació de flux de pistó) es poden atenuar amb llits en forma troncocònica, relacions L/D elevades o mitjançant la divisió del bioreactor tubular en plats.

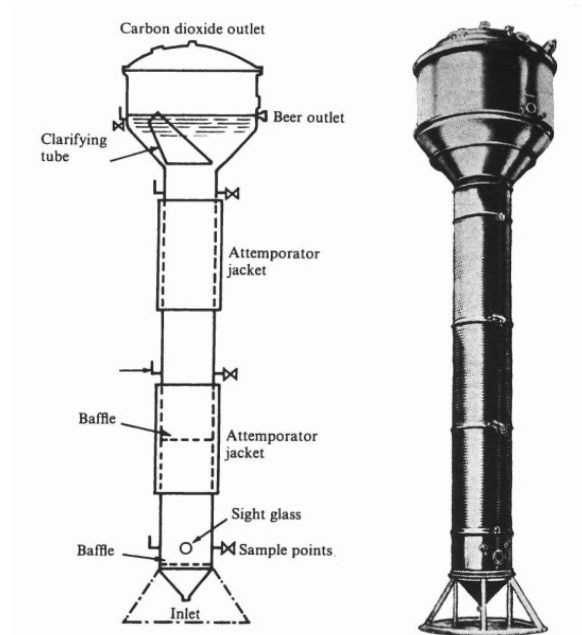


Figura 1.5. Bioreactor en torre de llit fluïditzat per a la producció de cervesa.
(B. Atkinson & F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*)

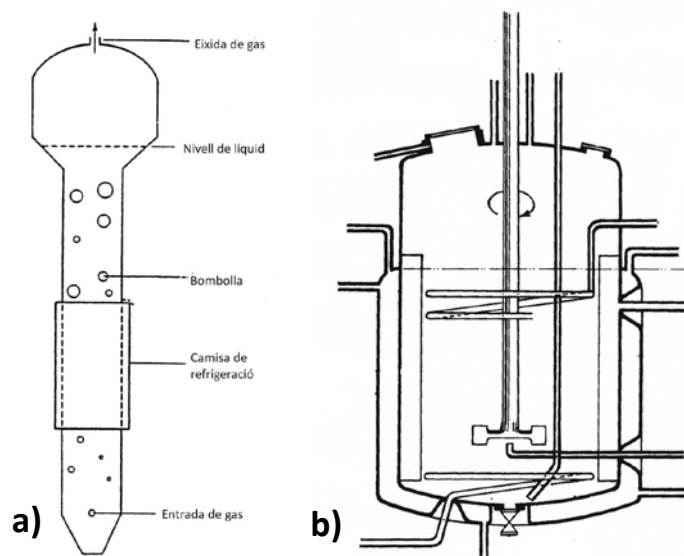


Figura 1.6. Dissenys de bioreactors convencionals amb aeració: a) columna de bombolles (*bubble column reactor*); b) bioreactor de tanc agitat mecànicament.
(B. Atkinson & F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*)

C) Provocant una bona transferència d'oxigen en sistemes aerobis

Els bioreactors utilitzats de forma convencional són els de tanc agitat mecànicament amb introducció d'aire per sota de l'agitador i les columnes de bombolles (Figura 1.6). Una alternativa a aquests sistemes són els reactors de flux guiats o de bucle: es tracta de bioreactors en els quals es produeix una circulació del fluid mitjançant l'ús d'un bucle interior o exterior en el qual es provoca la impulsió del líquid. Segons la naturalesa de l'impulsor que provoca la circulació del fluid, es poden classificar en (Figura 1.7):

- **Reactors de bucle amb hèlix** (*propeller loop reactor, PLR*): utilitzen un sistema mecànic d'hèlix per a fer circular el líquid.

- **Reactors de bucle per injecció** (*jet loop reactor*, JLR): s'introdueix i es dispersa el gas mitjançant un injector que fa circular el fluid a gran velocitat (>20 m/s). L'eficàcia del sistema depèn fonamentalment de la velocitat del fluid i del volum del bioreactor. Aquests sistemes són els que proporcionen més eficiència energètica en la transferència, però únicament es podran utilitzar amb microorganismes amb parets cel·lulars resistents, a causa de les elevades forces de cisalla a què es veuen sotmesos.

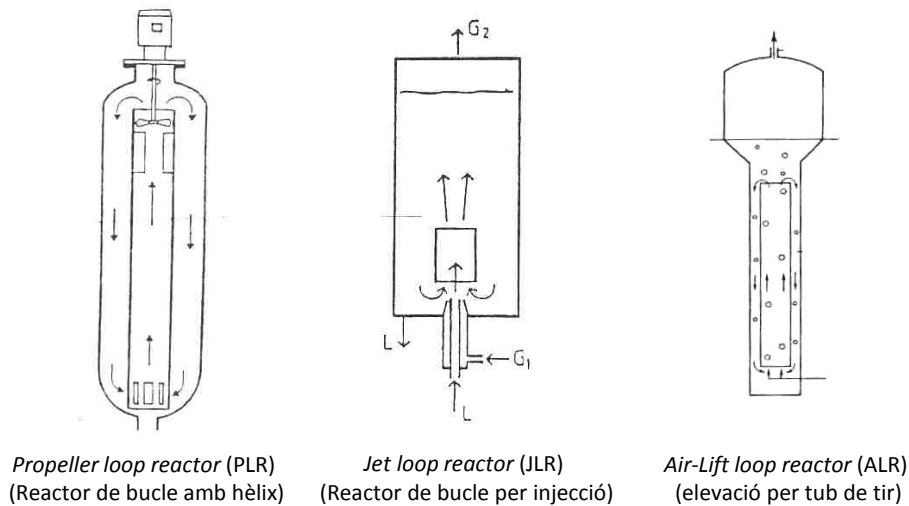


Figura 1.7. Reactors de flux guiat.

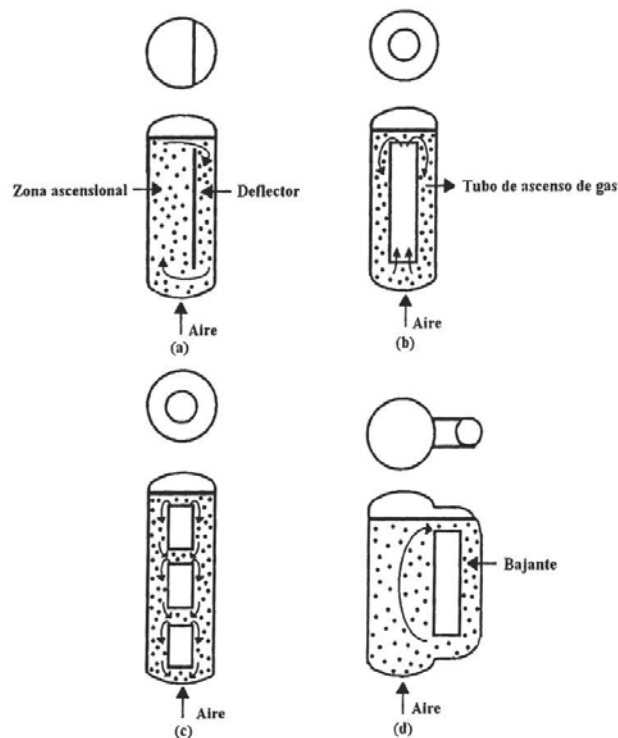


Figura 1.8. Configuracions de reactors *air-lift*: (a) reactor de bucle intern amb pantalla deflectora; (b) reactor de bucle intern de tub ascensional concèntric; (c) tub ascensional concèntric dividit en seccions; (d) reactor de bucle extern. (F. Gòdia i col., *Ingeniería bioquímica*)

- **Reactors de bucle per aire amb tub de tir** (*Air-lift loop reactor, ALR*): la circulació del fluid es produeix a causa de la diferència de densitat entre dos espais comunicats a causa de la introducció d'aire en un d'aquests espais. S'han proposat i assajat experimentalment una àmplia varietat de configuracions (Figura 1.8): de bucle intern, de bucle extern, amb diferents tipus de deflectors, amb diferents dissenys de tubs d'ascens, etc. Es pot dir que aquests tipus de reactors representen un concepte avançat i universal de bioreactor, ja que tot i ser un fermentador de disseny molt senzill, proporciona bones transferències d'oxigen, bona homogeneïtzació, forces de cisalla moderades, baix consum energètic i baixa contaminació. A escala comercial s'han desenvolupat reactors per a la producció de vinagre, àcid cítric, SCP (*single-cell protein*), antibiòtics, cultius de cèl·lules vegetals i producció d'anticossos monoclonals.

Quan, per causa de la fragilitat cel·lular, com per exemple en les fermentacions amb cèl·lules animals, no es pot dispersar l'oxigen mitjançant injecció i formació de bombolles, es poden utilitzar sistemes d'oxigenació mitjançant agitadors constituïts per fibres de membranes semipermeables (Figura 1.9). Un punt crític per a l'ús d'aquests sistemes en fermentació és que el mòdul de membranes ha de poder ser esterilitzat amb vapor sense ser danyat.

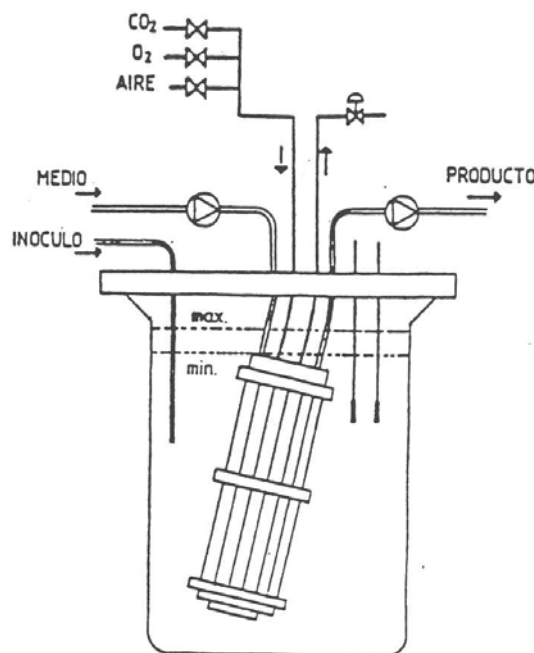


Figura 1.9. Oxigenació mitjançant agitador de fibres buides.

1.5.2 Reducció dels costos del procés

El cost de mà d'obra es pot reduir considerablement amb l'automatització, especialment si s'opera en continu. Quant a la reducció del cost energètic, el mínim s'obté amb els reactors de cultiu fix; els filtres percoladors en són un bon exemple. No obstant això, els inconvenients funcionals (camins preferencials, retenció de gasos, etc.) poden obligar a recórrer a algun tipus de sistema agitad. Els llits fluïditzats també presenten un consum energètic baix si s'operen en condicions de fluïdització mínima amb partícules biològiques de grandària i densitat adequades. En reactors agitats, els *air-lifts* són els de menor cost (pot

arribar a 1/5 respecte d'un FCTA equivalent), tot presentant considerables avantatges de funcionament en comparació als de llit fluiditzat: treballen en un interval de velocitats superficials de líquid i gas més ampli, amb una mescla més eficaç que evita la formació de d'acumulacions de gas, i permeten aconseguir majors coeficients de transferència de matèria.

1.5.3 Reducció dels costos de separació del producte

Els costos de separació poden constituir fins a un 90% del total d'un procés biotecnològic. Aquests costos dependran fonamentalment de la concentració al final de la bioreacció (Figura 1.10) i es poden minimitzar mitjançant la integració del procés de fermentació i recuperació del producte. Si això no és possible, s'ha de reduir al mínim el nombre d'etapes de separació, ja que a mesura que el nombre d'etapes augmenta, el rendiment del producte final decreix dràsticament. Les accions que poden dur-se a terme per a millorar el rendiment del procés de separació inclouen: l'ús de medis exempts de substàncies que puguen interferir en el procés de separació i l'obtenció de producte a la màxima concentració possible.

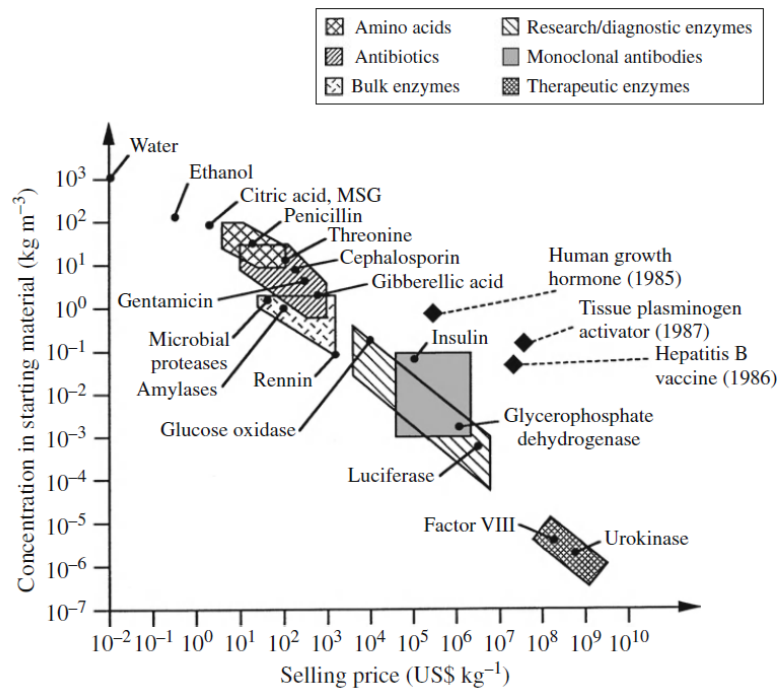


Figura 1.10. Relació entre el preu de venda i la concentració abans del procés de recuperació de diferents productes de fermentació.

(P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*)

Pel que fa a la integració de la separació amb el procés de fermentació, especialment interessant en casos d'inhibició pel producte, s'han desenvolupat diverses configuracions (Figura 1.11) entre les quals resulta interessant destacar:

- Fermentació al buit.
- Fermentació extractiva.
- Separació mitjançant membranes.

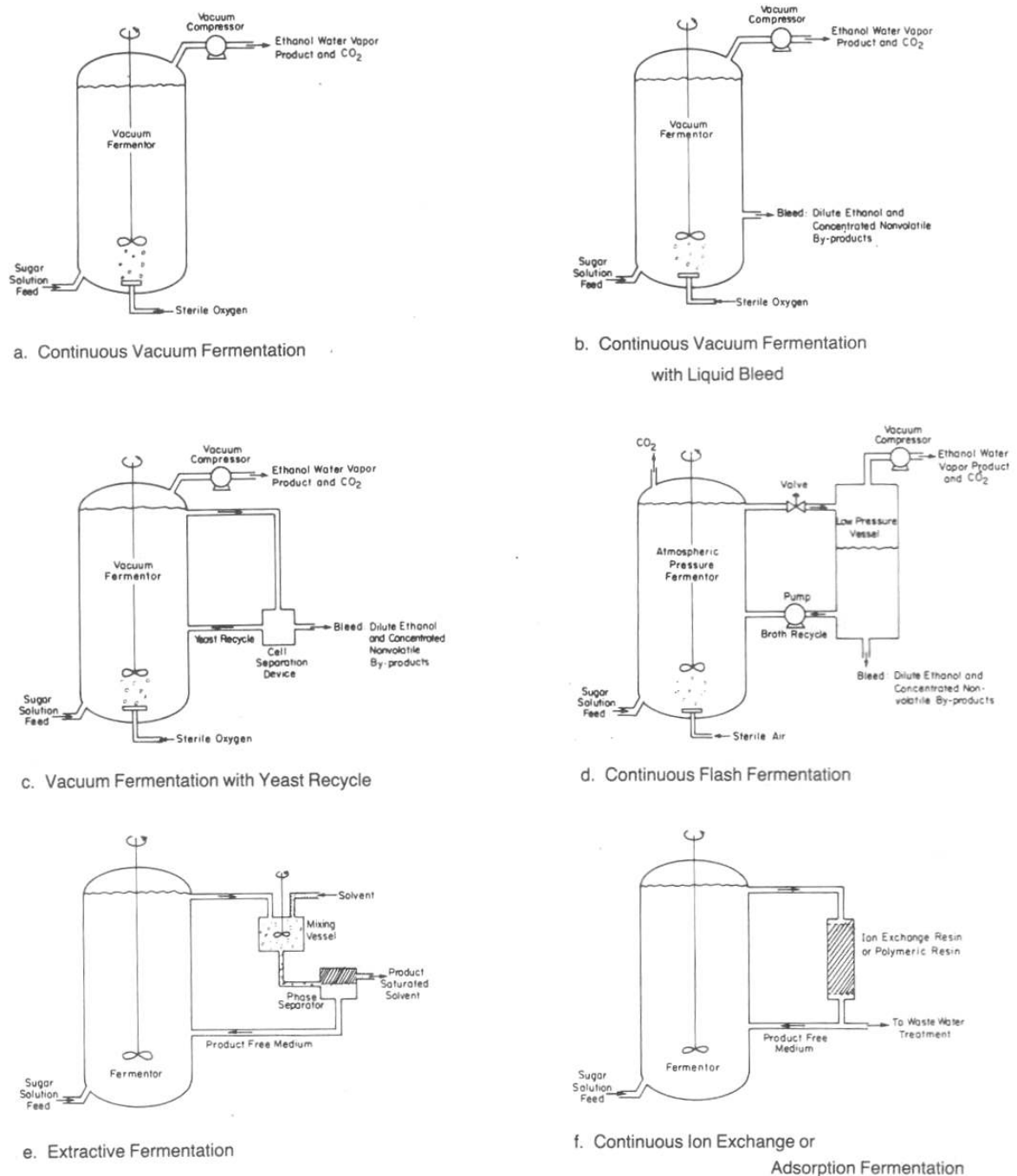


Figura 1.11. Recuperació *in situ* dels productes de fermentació.
 (S.R. Roffler i col., "In situ recovery of fermentation products". *Trends in Biotechnology*)

La integració bioreactor-destil·lació a baixa temperatura (buit) és una bona solució per a la producció d'etanol. Les principals limitacions operacionals consisteixen en l'acumulació de petites quantitats de materials no volàtils en la fase líquida del fermentador. S'han proposat variacions que inclouen la desorció de l'etanol en una columna de rebliment en sèrie amb el fermentador i la posterior recirculació del substrat no convertit. Per altra banda, la fermentació extractiva amb dissolvents, encara que ha estat provada, presenta com a principal inconvenient de trobar un dissolvent innocu per al biocatalitzador, ja siga cel·lular o enzimàtic.

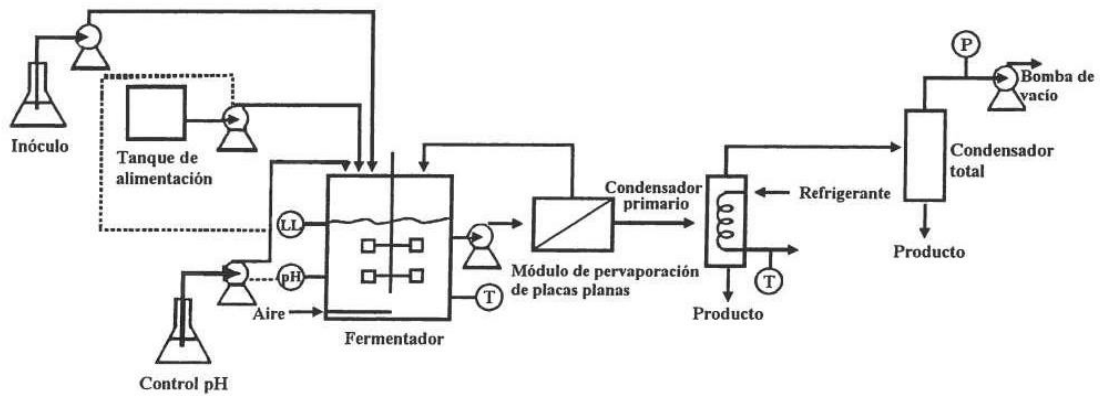


Figura 1.12. Fermentació acoblada a un sistema de pervaporació en continu.

(F. Gòdia i col., *Ingeniería bioquímica*)

Un concepte d'aplicació recent per a la recuperació d'un producte que siga relativament volàtil és la pervaporació (Figura 1.12). En aquest cas, la separació es fonamenta en la diferència de velocitat de transferència dels components a través d'una membrana semipermeable quan es manté un buit que facilita l'evaporació del component més volàtil, és a dir, s'empren dues forces impulsores. L'operació té lloc a baixa pressió i temperatura. El principal inconvenient està associat als embossaments que poden produir-se en la membrana.

TEMA 2

TRANSFERÈNCIA DE MATÈRIA EN BIOREACTORS

2.1	Transferència de matèria.....	2
2.2	Propietats reològiques dels medis de fermentació.....	3
2.2.1	Factors que influeixen la viscositat d'una fermentació.....	5
2.3	Aeració: transferència de matèria gas-líquid.....	6
2.3.1	Necessitats d'aeració.....	9
2.3.2	Determinació del coeficient de transferència de matèria, k_{La}	10
2.3.3	Variables que afecten la transferència de matèria.....	17
2.4	Agitació: Transferència de matèria per convecció forçada.....	22
2.4.1	Models de flux en fermentadors agitats.....	23
2.4.2	Tipus de rodets per a l'agitació de bioreactors.....	24
2.4.3	Requeriments de potència per agitació.....	25
2.4.4	Suspensió de sòlids.....	32

2.1 TRANSFERÈNCIA DE MATÈRIA

Els processos biocatalitzats es caracteritzen per la naturalesa heterogènia dels sistemes de reacció. El biocatalitzador en suspensió o fixat a un suport sòlid es posa en contacte amb un medi nutrent aquós perquè tinga lloc la reacció. A més, en el cas de bioprocessos aeròbics, hi ha una fase gas dispersa addicional, normalment bombolles d'aire. Per tant, perquè tinga lloc una reacció biocatalitzada, els components involucrats es transferiran de les regions d'alta concentració fins a aquelles de menys concentració de forma que resultarà clau que la transferència de matèria entre cadascuna de les fases implicades (sòlida, líquida i gasosa) siga adient. La Figura 2.1 il·lustra la complexitat involucrada en el desenvolupament d'una bioreacció.

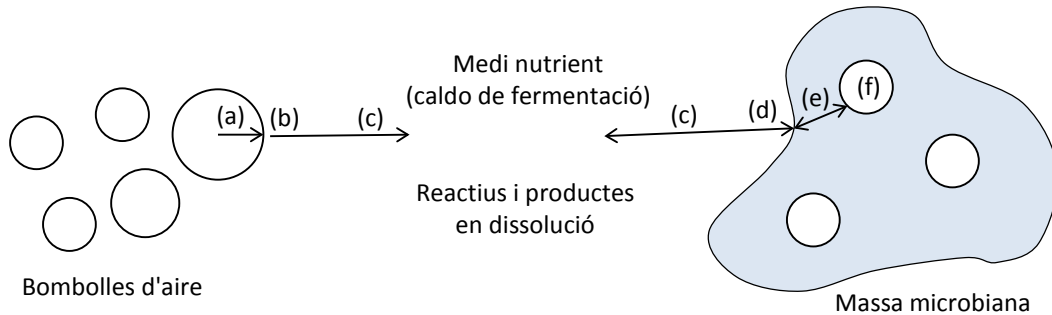


Figura 2.1. Etapes de transferència de matèria en una fermentació aeròbia.

El valor relatiu de les diferents resistències a la transferència de matèria depèn de la composició i propietats reològiques del fluid, de la intensitat de la mescla, de la grandària de les bombolles i de la grandària dels agregats de cèl·lules, entre altres factors. En qualsevol cas, per a la majoria de bioreactors es poden trobar les següents etapes, tal com s'ha esquematitzat en la Figura 2.1:

- **Transferència d'oxigen** des de la fase gas al medi aquós, que consta de les següents etapes:
 - Transferència d'oxigen des de l'interior de la bombolla fins a la interfase gas-líquid i a través d'aquesta interfície. Aquestes etapes presenten una resistència negligible, de forma que, a efectes pràctics, es pot considerar instantani el moviment d'oxigen fins a la part líquida de la interfase (a).
 - Difusió de l'oxigen a través de la pel·lícula, relativament immòbil, que envolta la bombolla (b), representa una resistència important a la transferència d'oxigen.
- **Transferència de matèria extracel·lular:** transport de reactius i productes entre la fase líquida i les cèl·lules o, en general, el biocatalitzador. També conté varies etapes:
 - **Transferència de matèria externa:**
 - Transport a través del si del líquid (c). En un fermentador de mescla completa, els gradients de concentració en el líquid són mínims i la resistència a la transferència de matèria es pot considerar negligible en la majoria de casos. No obstant això, en caldos de fermentació molt viscosos, la resistència a la transferència pot tindre valors importants.
 - Transport a través de la pel·lícula estacionària establerta al voltant del sòlid (d). En el cas de organismes unicel·lulars, la pel·lícula estacionària és molt fina i l'efecte sobre la transferència de matèria és negligible. Si el biocatalitzador es troba en el si d'una matriu sòlida o forma grans agregats, la resistència pot ser significativa.

- **Transferència de matèria interna:** quan el biocatalitzador es troba en un flòcul, agregat o partícula sòlida, tindrà lloc una difusió a través del sòlid fins a cada cèl·lula o enzim individual (e). En aquest cas, la resistència dependrà de la grandària del sòlid.
- **Transferència de matèria intracel·lular (f):** transport de reactius i productes a través del citoplasma fins a i des dels centres actius. Aquesta resistència, tot considerant les petites distàncies a recórrer, sol ser negligible.

Una volta en els centres actius, tindrà lloc la bioreacció pròpiament dita. Un dels objectius específics de l'enginyeria de bioprocessos és, precisament, dissenyar els sistemes de reacció per a minimitzar els processos de transport de matèria de manera que, en la mesura que siga possible, la cinètica de la reacció actue com a etapa controlant. En qualsevol cas, el coneixement dels fenòmens relacionats amb la transferència de matèria resulta clau per a l'operació o disseny correctes de processos biotecnològics a escala industrial.

2.2 PROPIETATS REOLÒGIQUES DELS MEDIS DE FERMENTACIÓ

La viscositat és la propietat més significativa en referència al comportament d'un fluid i, per tant, tindrà un efecte marcat en operacions com ara bombeig, agitació, transferència de matèria i energia, que al seu torn, contribuiran significativament tant en el disseny com en l'economia del procés. Les reaccions biocatalitzades poden afectar fortament la viscositat a causa de la presència de microorganismes, substrats, metabòlits i aire. Totes aquestes interaccions s'il·lustren esquemàticament en la Figura 2.2.

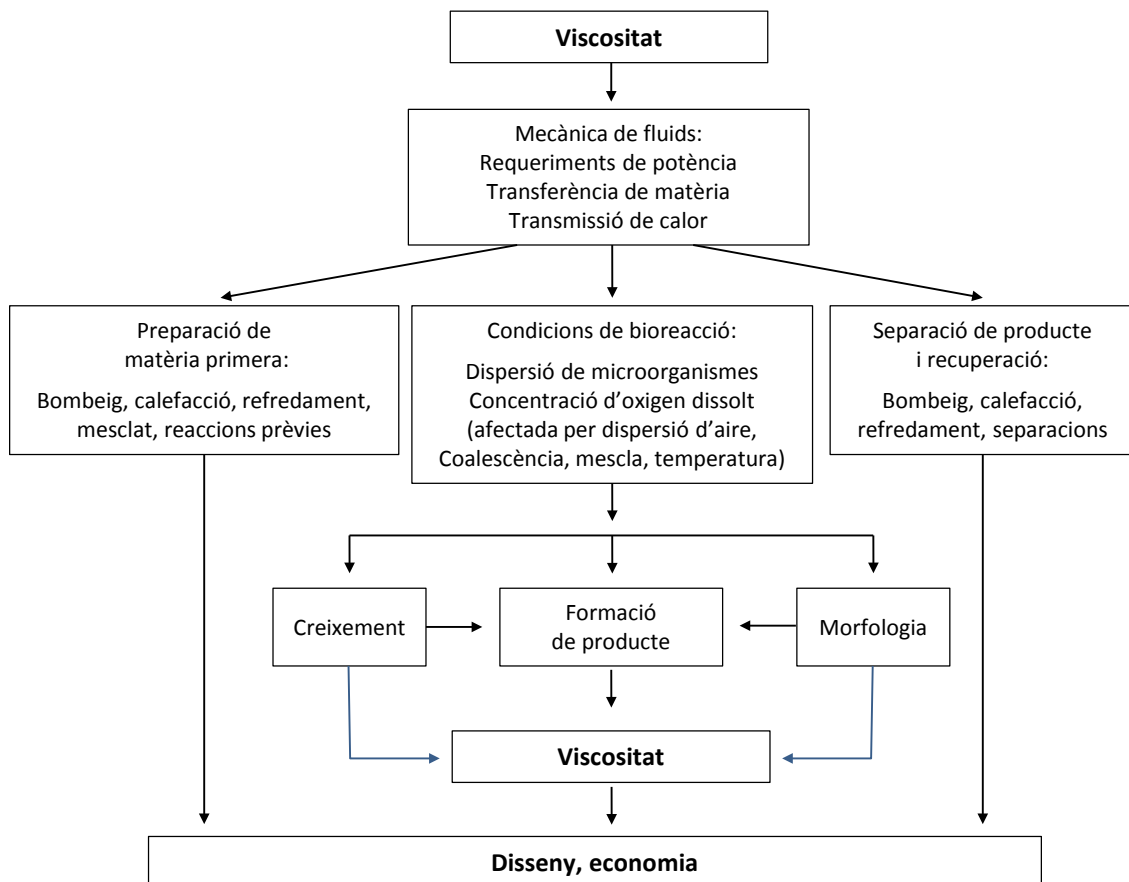


Figura 2.2. Representació esquemàtica de l'efecte de la viscositat en diverses etapes dels bioprocessos.

La viscositat és la propietat física dels fluids que genera la fricció interna en el flux, per tant està relacionada amb la resistència que oposen els fluids al moviment. Per a posar un fluid en moviment i mantenir un gradient de velocitat (dv/dy), cal aplicar una força per tal de vèncer la fricció que s'oposa a la circulació del fluid. Si es defineix τ com la tensió de tall (o tensió tallant), és a dir, la força de cisalla (F) que s'aplica al fluid per unitat de superfície (A):


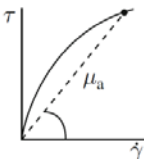
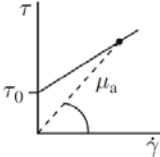
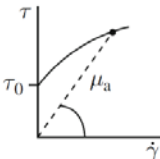
$$\tau = \frac{F}{A} \tag{Eq. 2.1}$$

Aquesta tensió, τ , tindrà una proporcionalitat amb el gradient de velocitat:

$$\tau = -\mu \frac{dv}{dy} = \mu \gamma \tag{Eq. 2.2}$$

on μ representa la constant de proporcionalitat. L'Eq. 2.2 representa la llei de viscositat de Newton, on μ representa la viscositat. El terme $-dv/dy$ se sol denominar velocitat de cisalla (o de deformació del fluid) i s'expressa generalment amb el símbol γ . Tal com s'ha definit, aquesta viscositat s'anomena també viscositat dinàmica, en contraposició a la relació μ/ρ , que seria la viscositat cinemàtica (on ρ és la densitat del fluid). Aquesta viscositat cinemàtica se sol expressar amb el símbol ν .

Taula 2.1. Fluids segons comportament reològic.

Fluid	Flow curve	Equation	Apparent viscosity μ_a
Newtonian		$\tau = \mu \dot{\gamma}$	Constant $\mu_a = \mu$
Pseudoplastic (power law)		$\tau = K \dot{\gamma}^n$ $n < 1$	Decreases with increasing shear rate $\mu_a = K \dot{\gamma}^{n-1}$
Bingham plastic		$\tau = \tau_0 + K_p \dot{\gamma}$	Decreases with increasing shear rate when yield stress τ_0 is exceeded $\mu_a = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K_p$
Casson plastic		$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + K_p \dot{\gamma}^{1/2}$	Decreases with increasing shear rate when yield stress τ_0 is exceeded $\mu_a = \left[\left(\frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} \right)^{1/2} + K_p \right]^2$

(P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*)

Els fluids que segueixen la llei de viscositat de Newton (Eq. 2.2), amb un valor de la viscositat (μ) independent de la velocitat de cisalla (γ), s'anomenen fluids newtonians. En la primera línia de la Taula 2.1 es mostra la corba del flux o *reograma* d'un fluid newtonià; el pendent de la representació de τ enfront de γ és constant i igual a μ . Això no implica que la

viscositat no varie amb altres paràmetres, com ara la temperatura, la pressió i la composició del fluid. Per altra banda, per als fluids no newtonians, la relació entre la tensió de tall i la velocitat de cisalla no és constant. Aquest fluids es classifiquen segons el tipus de relació entre τ i γ . Els tipus comuns de fluids no newtonians inclouen els pseudoplàstics, els *plàstics de Bingham* i els *plàstics de Carson*, tal com es mostra en la Taula 2.1, on s'inclouen els reogrames característics. Malgrat tot, la relació entre la tensió de tall i la velocitat de cisalla en un fluid no newtonià s'anomena *viscositat aparent* (μ_a).

Moltes suspensions i dispersions en bioprocessos, com ara les dissolucions de polímers de cadena llarga i altres macromolècules, solen ser fluids no newtonians, en la majoria dels casos, pseudoplàstics. Aquests tipus de fluids segueixen la llei exponencial, segons la qual la dependència entre tensió de tall i velocitat de cisalla ve donada per:

$$\tau = K\gamma^n \quad \text{Eq. 2.3}$$

on K és l'índex de consistència i n l'índex de comportament de flux. En fluids pseudoplàstics, tal com es mostra en la Taula 2.1, $n < 1$ i la viscositat aparent s'expressa mitjançant:

$$\mu_a = \frac{\tau}{\gamma} = K\gamma^{n-1} \quad \text{Eq. 2.4}$$

2.2.1 Factors que influeixen la viscositat d'una fermentació

Els canvis en la reologia dels caldos de fermentació poden ser deguts a la variació d'una o més de les propietats següents:

- Concentració cel·lular.
- Morfologia cel·lular: grandària, forma i densitat.
- Flexibilitat i capacitat de deformació de les cèl·lules.
- Pressió osmòtica del caldo de fermentació.
- Concentració de polímers en el medi (substrat i/o producte).
- Velocitat de cisalla (γ), en cas de fluids no newtonians.

Pel que fa a la concentració cel·lular, s'ha demostrat que l'equació de Vand (Eq. 2.5), proposada per a una suspensió d'esferes en un fluid newtonià, reproduïx de forma correcta el comportament de suspensions de llevat i espores per concentracions tan altes com 14% en volum de sòlids:

$$\mu = \mu_L(1 + 2,5\phi + 7,25\phi^2) \quad \text{Eq. 2.5}$$

on μ_L és la viscositat del líquid en el qual es troba la suspensió i ϕ la fracció volumètrica dels sòlids en suspensió. En bibliografia es poden trobar altres correlacions de la viscositat amb la concentració cel·lular per a molts altres casos en els quals la suspensió cel·lular no obeeix l'equació de Vand.

Quant a la morfologia cel·lular, els microorganismes filamentosos i les cèl·lules vegetals, poden exercir una influència elevada en el caldo de fermentació amb tendència a un comportament pseudoplàstic. Per altra banda, les cèl·lules petites, com ara els bacteris o llevats, no afecten de forma tan accentuada les propietats reològiques de les fermentacions.

La pressió osmòtica del medi de cultiu afecta negativament la turgència cel·lular. Així, més pressió osmòtica del medi dona lloc a més flexibilitat dels filaments (menys turgència), que redueix la viscositat del caldo.

Quan el producte de fermentació és un polímer, a mesura que avança la bioreacció en una procés en discontinu, augmentarà substancialment la viscositat del caldo. En aquests casos,

la concentració cel·lular sol tenir un efecte insignificant sobre la viscositat, ja que les propietats reològiques del fluid estan dominades pel polímer dissolt. Productes com ara dextrà, alginat o goma xantana presenten un comportament d'aquest tipus. En canvi, quan el medi de fermentació conté un substrat polimèric com el midó, la viscositat aparent disminuirà a mesura que la fermentació progressa. En fermentacions filamentoses, aquest canvi sol ser de poca durada: a mesura que les cèl·lules creixen i desenvolupen una xarxa filamentosa estructurada, el caldo tendeix a un comportament més pseudoplàstic i viscos malgrat que el substrat polimèric disminueix en el medi.

2.3 AERACIÓ: TRANSFERÈNCIA DE MATÈRIA GAS-LÍQUID

L'oxigen, generalment subministrat a partir d'un corrent d'aire estèril, s'ha de transferir de forma contínua al medi de fermentació, ja que la seua solubilitat és molt baixa. Així, la velocitat d'aportació d'oxigen al sistema haurà d'ésser almenys igual a la velocitat de consum en el bioreactor. Per tant, en sistemes aerobis, cal tenir en consideració dos aspectes: els requisits d'oxigen, determinats per la reacció biocatalitzada (pel metabolisme cel·lular en el cas d'una reacció microbiana), i la transferència de l'oxigen des de les bombolles d'aire al medi líquid, que és una operació purament física governada per la resistència a la seua transferència. Tal com s'ha indicat més amunt, l'oxigen molecular en fase gasosa haurà de passar a través d'una sèrie de resistències al transport fins a arribar al centre actiu del biocatalitzador. La magnitud de les resistències depèn de nombrosos factors, com ara la hidrodinàmica de les bombolles, la temperatura, l'activitat i densitat cel·lular, la composició de la dissolució, fenòmens associats a la interfase, etc.

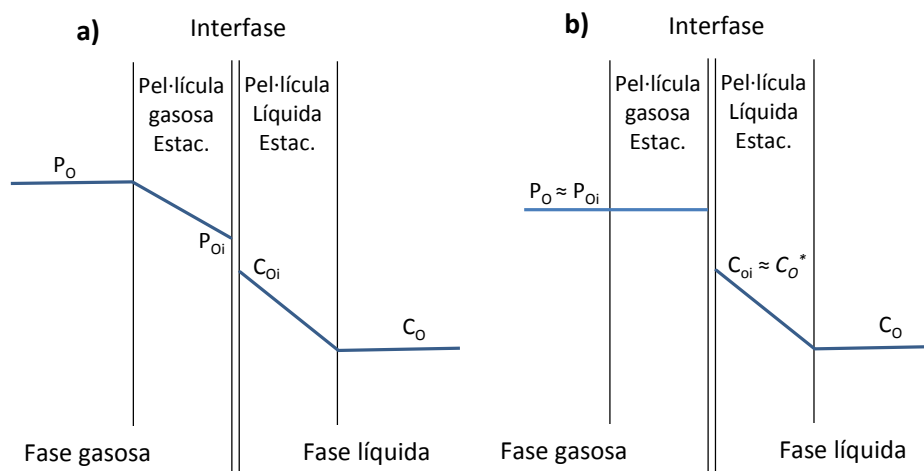


Figura 2.3. Perfils de concentració d'oxigen en les proximitats de la interfase gas-líquid: a) cas general; b) resistència en la fase gas negligible.

Pel que fa a la transferència d'un determinat component entre dues fases fluides, com per exemple des d'una fase gasosa fins a una fase líquida, hi haurà essencialment dues resistències en sèrie associades a les pel·lícules estacionàries que es formen en la interfase entre les dues fases. En efecte, en aquestes pel·lícules la transferència es produeix per difusió, ço és, mitjançant un transport molecular i, per tant, la resistència a la transferència serà molt més gran que en el si dels fluids on el transport serà turbulent. Així, si s'observa el perfil de concentracions (expressades en termes de pressió parcial del component en la fase gas) de la Figura 2.3 a), es pot veure com seran plans en el si de les fases fluides (resistència negligible), mentre que a través de les pel·lícules estacionàries hi ha una variació

de les concentracions relacionada amb les resistències associades al transport molecular per difusió.

En aquest cas, la transferència de matèria per unitat de volum de reactor, N_A (kg/(m³·h)), és proporcional a la diferència de concentracions entre la interfase i el si de la fase fluida (ço és, la força impulsora). Si el component es transfereix des de la fase gas fins a la fase líquida, N_G , la concentració normalment s'expressa en termes de pressió parcial i el flux de matèria ve donat per:

$$N_G = k_G a (P_O - P_{Oi}) \quad \text{Eq. 2.6}$$

on P_O i P_{Oi} , representen la pressió parcial en el si de la fase i en la interfase, respectivament. k_G és el coeficient individual de transferència a través de la fase gasosa i a és l'àrea d'interfase per unitat de volum del sistema.

Anàlogament, per la banda de la fase líquida, el flux de matèria vindrà determinat per:

$$N_L = k_L a (C_{Oi} - C_O) \quad \text{Eq. 2.7}$$

on, en aquest cas, k_L és el coeficient individual de transferència de matèria en la fase gas i on C_O i C_{Oi} , les concentracions de component en el si de la fase líquida i en la interfase, respectivament.

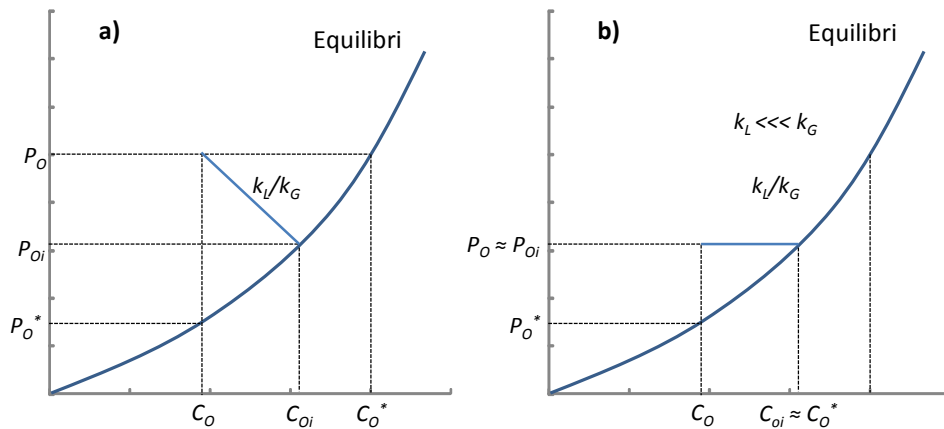


Figura 2.4. Corba d'equilibri gas-líquid: a) cas general; b) resistència en la fase gas negligible (k_G molt més gran que k_L).

Com que la quantitat de matèria que es transfereix entre ambdues fases és necessàriament la mateixa,

$$N_A = N_G = N_L \quad \text{Eq. 2.8}$$

de forma que si hom iguala les equacions Eq. 2.6 i Eq. 2.7, obtenim:

$$\frac{P_O - P_{Oi}}{C_{Oi} - C_O} = \frac{k_L}{k_G} \quad \text{Eq. 2.9}$$

de manera que la relació entre els dos coeficients individuals de transport, k_L/k_G , és igual al pendent de la recta que uneix les concentracions del component en el si de les dues fases fluides (C_O, P_O) amb els corresponents valors en la interfase (C_{Oi}, P_{Oi}), tal com es pot veure en la representació de la corba d'equilibri (Figura 2.4 a).

Com que normalment no és factible obtenir informació experimental de les concentracions en la interfase (C_{Oi}, P_{Oi}), en la pràctica es defineixen els coeficients globals de transferència de matèria:

$$N_A = K_G a(P_O - P_O^*) = K_L a(C_O^* - C_O) \quad \text{Eq. 2.10}$$

on P_O^* representa la pressió parcial del component que estaria en equilibri amb la concentració en el si de la fase fluida (C_O), que pot ser fàcilment obtinguda a partir de la relació d'equilibri (Figura 2.4 a). Anàlogament, C_O^* és la concentració en la fase líquida que estaria en equilibri amb un gas que tinguera una pressió parcial del component que es transfereix igual a P_O . En aquest cas, els paràmetres K_G i K_L representen els coeficients globals de transferència de matèria referits a la fase gasosa i a la líquida, respectivament.

Per a gasos poc solubles en la fase líquida, com en el cas particular de l'oxigen en un medi aquós, la resistència a la transferència de matèria (oxigen, en aquest cas particular) és molt més gran en la pel·lícula líquida que en la gasosa. Això fa que el coeficient individual de transferència de matèria en la fase líquida siga molt més petit que el de la fase gasosa i, en conseqüència, la relació k_L/k_G és molt petita, pràcticament zero, tal com es pot observar a la Figura 2.4 b. Per tant, la pressió parcial d'oxigen en la fase gas (P_O) serà pràcticament igual a la de la interfase (P_{O_i}) i per això, la concentració de oxigen en la interfase (C_{O_i}) coincidirà pràcticament amb la concentració d'equilibri (C_O^*). Així, el perfil en la fase gasosa serà també pla en la banda de la pel·lícula estacionària, tal com s'ha representat en la Figura 2.3 b. Com a conseqüència de tot això, es pot afirmar que per al cas de l'oxigen, la diferència entre el coeficient global de transferència de matèria en la fase líquida i el coeficient individual és negligible:

$$K_L \approx k_L \quad \text{Eq. 2.11}$$

Per tant, la velocitat de transferència d'oxigen, N_A , per unitat de volum de reactor (kg O_2 /($m^3 \cdot h$)), es pot quantificar mitjançant:

$$N_A = k_L a(C_O^* - C_O) \quad \text{Eq. 2.12}$$

on C_O (kg O_2/m^3) és la concentració d'oxigen en el si de la fase líquida en qualsevol moment t ; C_O^* (kg O_2/m^3) és la concentració d'oxigen en la interfase gas-líquid (que coincideix pràcticament amb la concentració d'equilibri), a (m^2/m^3) és l'àrea d'interfase per unitat de volum del sistema, i k_L (m/h) és el coeficient de transferència de matèria en la fase líquida. És a dir, la velocitat de transferència de matèria depèn del coeficient de transferència, de l'àrea de la interfase i de la força impulsora que origina els canvis en la concentració.

Taula 2.2. Demanda específica d'oxigen i concentració crítica per a diferents microorganismes.

Organisme	Q_{O_2} ($mMO_2/g \text{ cèl} \cdot \text{lules} \cdot h$)	$C_{\text{crítica}}$ (mg/L)
<i>Aspergillus niger</i>	3,0	
<i>Streptomyces griseus</i>	3,0	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	3,9	0,40
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4,0	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	8,0	0,60
<i>Escherichia coli</i>	10,8	0,26
<i>Candida utilis</i>		1,10
<i>Pseudomonas ovalis</i>		2,00

(Atkinson, B. i Mavituna, F., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*).

La concentració de saturació C_O^* depèn de les condicions de pressió, temperatura i composició del medi, normalment varia entre 7 i 9 ppm (equivalents a mg/L en solució aquosa diluïda). La concentració d'oxigen en el medi, C_O pot ser teòricament tan baixa com

zero, però en fermentacions reals hi ha una concentració crítica per a cada tipus de microorganisme per sota de la qual es produeix una alteració del seu metabolisme. Aquest concentració crítica sol variar entre el 5 i el 10% de la concentració de saturació. En la Taula 2.2 es resumeixen les concentracions crítiques per a alguns microorganismes. Per altra banda, tal com es discutirà més avall, tant l'àrea de la interfase com el coeficient de transferència de matèria depenen de les condicions d'operació i de les propietats físiques del medi. L'àrea de la interfase serà en funció del tipus de bombolles produïdes i el coeficient de transferència de matèria del règim de flux establert.

2.3.1 Necessitats d'aeració

El disseny del sistema d'aeració o aeració-agitació es realitza de manera que la transferència d'oxigen no siga l'etapa limitant del procés. L'objectiu del disseny és aconseguir un valor de kLa perquè la velocitat de transferència d'oxigen N_A siga igual o superior a la velocitat de consum d'oxigen dels microorganismes.

La **demanda d'oxigen** per a sistemes microbians es pot calcular mitjançant la següent expressió:

$$\text{Demanda d'oxigen} \left(\frac{\text{g O}_2}{\text{m}^3\text{h}} \right) = Q_{O_2} \left(\frac{\text{g O}_2}{\text{g cèl}\cdot\text{lules h}} \right) X \left(\frac{\text{g cèl}\cdot\text{lules}}{\text{m}^3} \right) \quad \text{Eq. 2.13}$$

on Q_{O_2} representa la demanda específica d'oxigen i X , la concentració de biomassa activa.

La demanda específica d'oxigen es pot expressar en funció de la velocitat específica de creixement (μ) i el paràmetre de rendiment d'oxigen (Y_{XO}):

$$Q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{XO}} \quad \text{Eq. 2.14}$$

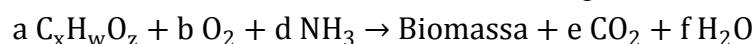
on el rendiment oxigen-biomassa es defineix com:

$$Y_{XO} = \frac{\text{g cèl}\cdot\text{lules sintetitzades}}{\text{g O}_2 \text{ a aportar}} \quad \text{Eq. 2.15}$$

En un sistema microbià, entre els diferents factors dels quals depèn la demanda d'oxigen es troben el tipus de microorganisme, la fase de creixement, la font de carboni, pH i l'objectiu de la reacció bioquímica (degradar substrat, produir biomassa, obtenir metabòlit secundari, etc.). Si el procés està controlat per la transferència d'oxigen, caldrà tenir en compte la relació entre la velocitat específica de creixement de microorganismes amb la concentració d'oxigen dissolt, normalment en la forma:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_O}{K_O + C_O} \quad \text{Eq. 2.16}$$

El rendiment d'oxigen en general, Y_{XO} , està relacionat amb el rendiment de la font de carboni, Y_{XS} (g cèl·lules/g substrat). A partir de la composició del microorganisme i la font de carboni, es pot estimar el rendiment d'oxigen mitjançant un esquema de reacció simplificat en què només es considere en la bioreacció la font de carboni i nitrogen:



Tot plantejant el balanç per cada element químic i prenent com a base de càlcul 1 gram de biomassa sintetitzada, el rendiment d'oxigen es podrà aproximar mitjançant:

$$\frac{1}{Y_{XO}} = 16 \left[\frac{2x + \frac{w}{2} - z}{Y_{XS} M_{Sust}} - \frac{C\%}{600} - \frac{H\%}{200} + \frac{O\%}{1600} + \frac{3N\%}{2800} \right] \quad \text{Eq. 2.17}$$

on Y_{XS} és el rendiment biomassa-substrat; M_{sust} , el pes molecular del substrat, i $C\%$, $H\%$, $O\%$, $N\%$ els percentatges d'aquests elements en la composició de les cèl·lules generades. En la Taula 2.3 es resumeixen els intervals de valors possibles de rendiments biomassa / substrat, Y_{XS} . En la Taula 2.4 es mostren composicions cel·lulars típiques.

Taula 2.3. Rendiments per diferents fonts de carboni, Y_{XS} .

Substrat	Y_{XS} , valors mitjans (g cèl·lules / g substrat)	Y_{XS} , interval
Sucres	0,5	0,18 - 0,65
Alcohols	0,4	0,19 - 0,70
n-parafines	1,0	0,70 - 1,30
Metà	1,0	0,30 - 1,40

(Atkinson, B. i Mavituna, F., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*).

Taula 2.4. Composició cel·lular.

Element %	Bacteri (Carbohidrat)*	Llevat (Carbohidrat)	Bacteri (Metà)	Llevat (n-parafina)
C	45,6	47,0	53,0	46,0
H	7,6	6,0	7,3	7,0
O	30,2	32,5	19,0	25,0
N	12,1	8,5	12,0	9,8
Cendres	5,5	6,0	8,7	12,2

* Substrat emprat per al creixement cel·lular.

(Atkinson, B. i Mavituna, F., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*).

2.3.2 Determinació del coeficient de transferència de matèria, $k_L a$.

Per tal de dur a terme un disseny acurat de la transferència d'oxigen en un bioreactor es poden utilitzar correlacions teòriques, aplicables en un ampli marge de sistemes gas-líquid, a més del sistema aire-aigua. No obstant això, el càlcul és feixuc i el valor obtingut pot variar àmpliament. Fins i tot és possible que no es puguin trobar correlacions adients per al sistema de treball. És per això que, en molts casos, resulta interessant realitzar una determinació experimental de la transferència d'oxigen o utilitzar correlacions de caire empíric.

Tal com s'ha discutit prèviament, la velocitat de transferència d'oxigen per unitat de volum, N_A , es pot quantificar mitjançant:

$$N_A = K_L a (C_O^* - C_O) = k_L a (C_O^* - C_O) \quad \text{Eq. 2.18}$$

Com que l'oxigen és molt poc soluble en aigua, el coeficient de transferència de matèria global, K_L , coincideix pràcticament amb el coeficient de transferència individual, k_L . És necessari recordar que en l'operació d'un bioreactor cal maximitzar la taxa de transferència d'oxigen fent servir consums energètics i cabals d'aire mínims. Per a maximitzar la transferència d'oxigen caldria maximitzar cadascun dels tres termes de l'equació Eq. 2.18: k_L , a , $(C_O^* - C_O)$. Però la força impulsora, $(C_O^* - C_O)$, està molt limitada tenint en compte que la concentració d'equilibri o saturació, C_O^* , és molt baixa i la concentració en el medi, C_O , ha de ser igual o més gran que la concentració crítica del sistema considerat. Per tant, la

clau en l'optimització rau en el coeficient de transferència de matèria, k_L , i en la superfície específica, a .

Normalment, per qüestions econòmiques es fa servir aire com a font d'oxigen per a les reaccions biocatalitzades aeròbies. Així, la màxima concentració d'oxigen en aigua serà la d'equilibri amb aire, aproximadament una cinquena part de solubilitat observada en equilibri amb oxigen gasós pur. La concentració d'oxigen en equilibri en fase aquosa (C_O^*) per a una determinada pressió parcial d'oxigen (P_O) es pot relacionar mitjançant la llei de Henry:

$$C_O^* = \frac{P_O}{H_O(T)} \quad \text{Eq. 2.19}$$

on $H_O(T)$ representa la constant de la llei de Henry a una temperatura T . Per exemple, $H_O(25^\circ\text{C}) = 0,793 \text{ atm}\cdot\text{L}/\text{mmol}$. En conseqüència, la concentració d'equilibri d'oxigen en aigua en equilibri amb aire a 25°C serà:

$$C_O^* = \frac{0,209 \text{ atm}}{0,793 \text{ atm}\cdot\text{L}/\text{mmol}} = 0,264 \text{ mmol O}_2/\text{L} = 8,43 \text{ mg O}_2/\text{L}$$

A partir de valors de solubilitats d'oxigen en diferents condicions (com ara les presentades a la Taula 2.5) es poden obtenir els corresponents valors de la constant de la llei de Henry.

Taula 2.5. Solubilitat del oxigen en solucions aquoses a 25°C .

Conc. (mol/L)	Solubilitat (mmol O ₂ /L)		
	HCl	H ₂ SO ₄	NaCl
0,0	1,26	1,26	1,26
0,5	1,21	1,21	1,07
1,0	1,16	1,12	0,89
2,0	1,12	1,02	0,71

(Todt F., *Electrochemische Sauer-stoffmessungen*).

2.3.2.1 Determinació experimental

La determinació experimental per separat de k_L i a pot resultar molt complexa i algunes vegades impossible. És convenient, per tant, calcular directament el producte $k_L a$. El terme combinat $k_L a$ se sol anomenar coeficient volumètric de transferència de matèria encara que sovint, de forma impròpia, pot aparèixer en bibliografia com a coeficient de transferència de matèria en comptes de k_L .

Els mètodes experimentals més freqüentment utilitzats per a la determinació del coeficient de transferència d'oxigen es poden classificar en:

- Mètodes indirectes: Oxidació de sulfit
 Desgasificació estàtica
- Mètodes directes: Balanç en estat estacionari
 Dinàmic

Totes les tècniques estan basades en el balanç d'oxigen. Un dels punts més crítics, comú a tots els mètodes que utilitzen la mesura de la concentració d'oxigen en dissolució, és la sensibilitat i temps de resposta de l'elèctrode d'oxigen utilitzat per a la mesura d'aquesta concentració.

Els mètodes indirectes s'apliquen a sistemes en els quals no s'està efectuant una fermentació. S'utilitzen mitjans sintètics que tracten de reproduir les condicions de fermentació sense la complicació dels cultius vius. Els valors obtinguts per aquests procediments són

aproximacions poc precises que es poden utilitzar per a comparar diferents reactors que operen en condicions similars.

Considerant que l'objectiu principal és trobar la dependència del k_{LA} amb la hidrodinàmica del sistema, el medi sintètic hauria de complir les següents restriccions:

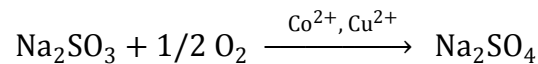
1. La viscositat de la solució ha de representar el comportament reològic del medi de fermentació.
2. La resistència en la interfície gas-líquid ha de ser constant.
3. La tendència de la coalescència de les bombolles ha de ser molt similar.
4. La solubilitat i difusió de l'oxigen han de ser constants.

Idealment, les velocitats de transferència d'oxigen haurien de mesurar-se en bioreactors amb el caldo nutritiu i el biocatalitzador d'interès. Això evidentment complica els experiments de transferència de matèria, ja que es requereix tot l'equip per a la preparació del medi i de l'inòcul, caldria prevenir la contaminació i mantenir el control ambiental per al cultiu cel·lular.

Els mètodes directes es duen a terme utilitzant fermentadors reals i el valor que s'obté és més representatiu, resulta molt útil per a determinar condicions d'operació. A més, com que per a escalar un procés bioquímic és necessari mantenir la concentració d'oxigen dissolt i la velocitat de transferència d'oxigen, la mesura directa de k_{LA} en els equips de laboratori i de planta pilot també resulta molt útil per al canvi d'escala.

Oxidació de sulfit sòdic

Aquest mètode es fonamenta en l'oxidació de sulfit a sulfat en presència d'un catalitzador (Co^{2+} o Cu^{2+}). La reacció d'oxidació és molt més ràpida que la transferència d'oxigen, amb la qual cosa la cinètica d'oxidació és controlada per la velocitat de transferència. A més, es pot considerar que aquesta cinètica és independent de la concentració de sulfit en un interval bastant ample de concentracions (de 0,04 a 1N).



Per a quantificar la transferència d'oxigen s'introdueix el sulfit en el bioreactor (conc. 1N) en presència de catalitzador (1 mM). En el moment en què es connecta el subministrament d'oxigen, es duu a terme un seguiment de la concentració de sulfit amb el temps de forma que el pendent de l'evolució temporal quantifica la velocitat de consum de sulfit que determinarà, amb la corresponent relació estequiomètrica, la velocitat de transferència d'oxigen, N_A . A partir de la transferència es pot determinar el coeficient volumètric de transferència k_{LA} fent ús de l'equació Eq. 2.18, on la concentració en el si del bioreactor es pot considerar negligible ($C_O = 0$) i, per altra banda, és coneguda la concentració d'oxigen en equilibri (C_O^*).

La principal limitació d'aquesta tècnica rau en el fet que la solució no pot aproximar-se a les propietats físiques i químiques d'un caldo de fermentació. Un problema addicional és que aquesta tècnica requereix concentracions iòniques elevades (1 a 2 mol/L) que poden afectar l'àrea interfacial (a) i, en menor mesura, el coeficient de transferència de matèria (k_L). Encara que aquest mètode s'ha utilitzat extensivament, no resulta recomanable en tant que dona valors del coeficient de transferència molt més alts que altres metodologies. En qualsevol cas, aquesta tècnica pot resultar útil d'un punt de vista relatiu per a comparar diferents bioreactors o per a estudiar l'efecte del canvi d'escala.

Desgasificació estàtica

Per a emprar aquesta tècnica, es comença per reduir a 0 el contingut d'oxigen del líquid en el bioreactor mitjançant la introducció de nitrogen, lliure d'oxigen. A partir del moment en el qual $C_O = 0$, ja es pot prendre l'origen de temps ($t_1 = 0$) i procedir a l'aeració del medi, de forma que es duu a terme l'enregistrament de la concentració d'oxigen dissolt, C_O , en funció del temps. L'equació que descriu el procés ve donada pel balanç d'oxigen, tenint en compte que l'acumulació serà igual a la transferència d'oxigen (terme d'entrada):

$$\frac{dC_O}{dt} = K_L a (C_O^* - C_O) \quad \text{Eq. 2.20}$$

que integrant a partir de la condició inicial de $C_O = 0$ per al temps $t = 0$:

$$\ln \left(1 - \frac{C_O}{C_O^*} \right) = -K_L a \cdot t \quad \text{Eq. 2.21}$$

d'aquesta forma, el pendent de la línia recta obtinguda a partir de la representació gràfica de $\ln \left(1 - \frac{C_O}{C_O^*} \right) = f(t)$ és numèricament igual a $-K_L a$, tal com se'n desprèn de la Figura 2.5.

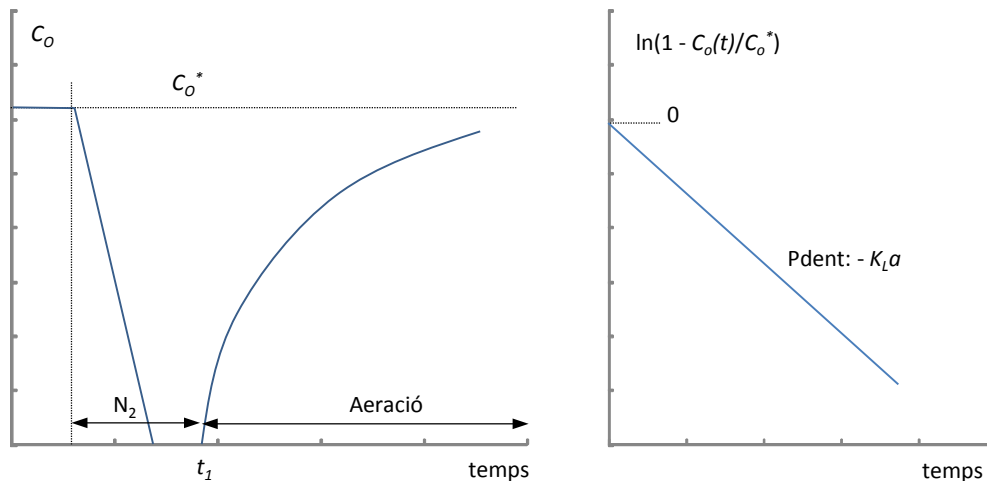


Figura 2.5. Mètode de desgasificació estàtica.

Balanç en estat estacionari en un bioreactor agitat

El balanç d'oxigen en un bioreactor de tanc agitat quan hi ha entrada i eixida d'oxigen associat al corrent de gas ve donat per:

$$Q_g(Y_2 - Y_1) + V \frac{dC_O}{dt} = -VQ_{O_2}X \quad \text{Eq. 2.22}$$

on V és el volum del fermentador, Q_g , el cabal d'aire (si s'admet negligible la variació del cabal entre l'entrada i l'eixida del bioreactor) i Y_1 , Y_2 , les concentracions d'oxigen en els corrents d'aire d'entrada i eixida, respectivament. En estat estacionari, quan la variació de la concentració d'oxigen en dissolució és negligible, el balanç d'oxigen es pot simplificar a la següent expressió:

$$Q_g(Y_1 - Y_2) = VQ_{O_2}X \quad \text{Eq. 2.23}$$

i com que, a més, en estat estacionari la transferència d'oxigen haurà de ser igual a la velocitat de consum d'oxigen:

$$Q_{O_2}X = k_L a (C_O^* - C_O) \quad \text{Eq. 2.24}$$

d'on se'n dedueix:

$$k_L a = \frac{Q_g(Y_1 - Y_2)}{V(C_o^* - C_o)} \quad \text{Eq. 2.25}$$

Per a conèixer $k_L a$ únicament serà necessari determinar les concentracions d'oxigen en els corrents d'aire d'entrada i de sortida, i el valor de C_o en el bioreactor en estat estacionari. Aquest mètode és un procediment fiable per a la determinació de $k_L a$ sempre que la diferència entre la concentració d'oxigen en els corrents d'aire d'entrada i sortida siga significativa. A més, un avantatge important és que pot aplicar-se als bioreactors durant l'operació.

Tècnica dinàmica

Aquesta metodologia es fonamenta en el seguiment de la concentració d'oxigen en dissolució al llarg d'una fermentació (Figura 2.6.a). Consisteix a introduir aire fins a assolir un nivell constant de la concentració d'oxigen (C_{oe}) en el fermentador (tram I). A partir d'aquest moment, es procedeix a la desconnexió del subministrament d'aire i es registra l'evolució del descens de la concentració d'oxigen dissolt (tram II), que permet obtenir la velocitat de consum d'oxigen a partir del pendent ($r_o = -Q_{O_2}X = -\mu X/Y_{XO}$). El subministrament d'aire es torna a connectar abans que la concentració caiga per sota del valor crític i es fa el seguiment de l'augment de la concentració amb el temps (tram III).

En aquest sistema, el balanç d'oxigen ve donat per:

Acumulació = Aportació per transferència + Generació

$$\frac{dC_o}{dt} = K_L a(C_o^* - C_o) - \frac{\mu X}{Y_{XO}} \quad \text{Eq. 2.26}$$

En el tram I, la variació de la concentració amb el temps és negligible i, per tant, no hi ha acumulació, de forma que la velocitat de d'aportació d'oxigen serà igual a la velocitat de consum cel·lular i s'assoleix una concentració d'equilibri (C_{oe}).

$$Q_{O_2}X = K_L a(C_o^* - C_{oe}) \quad \text{Eq. 2.27}$$

En el tram II, quan s'atura el subministrament d'aire, es complirà:

$$\frac{dC_o}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{XO}} = -Q_{O_2}X \quad \text{Eq. 2.28}$$

En el tram III es complirà el balanç complet (Eq. 2.26), de forma que si es representa la concentració d'oxigen dissolt front al temps i s'obté per cada valor de C_o el pendent de la corba (dC_o/dt), $k_L a$ es pot determinar mitjançant la linealització de l'Eq. 2.26, prenent com a variable dependent C_o :

$$C_o = C_o^* - \frac{1}{K_L a} \left[Q_{O_2}X + \frac{dC_o}{dt} \right] \quad \text{Eq. 2.29}$$

D'aquesta forma, en representar $C_o = f(Q_{O_2}X + dC_o/dt)$ s'obté una línia recta amb un pendent $-1/K_L a$ i ordenada en l'origen C_o^* , tal com es representa en la Figura 2.6.b.

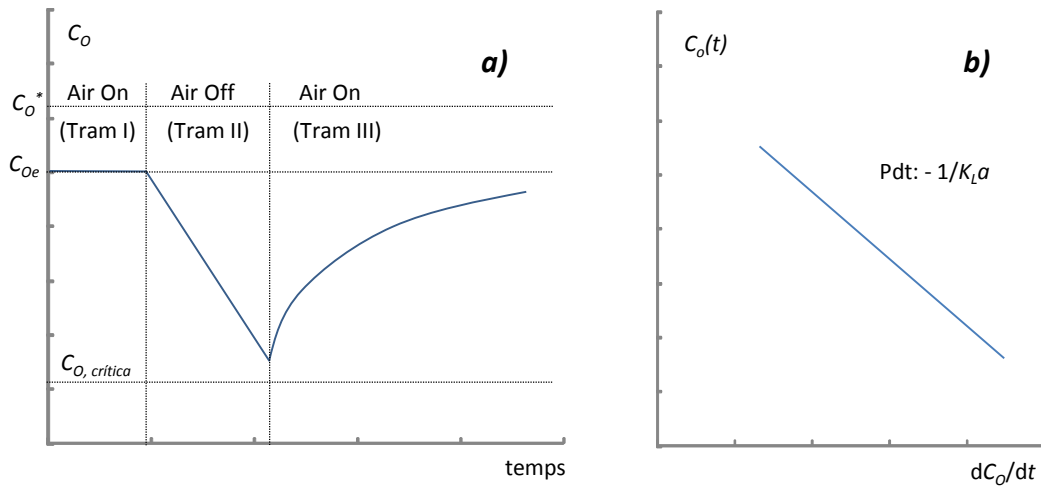


Figura 2.6. Mètode dinàmic per a la determinació de k_La .

2.3.2.2 Estimacions teòriques

A més de la determinació experimental de k_La , es poden realitzar estimacions tant del coeficient de transferència, k_L , com de l'àrea interfacial, a , mitjançant l'aplicació de teories de flux entre ambdues fases, gas i líquid. Aquestes teories relacionen els paràmetres amb les propietats físiques del sistema, densitat i viscositat, i amb les condicions d'operació, velocitat de circulació i tipus de bombolles.

El coeficient de transferència de matèria pot ser estimat mitjançant la teoria sobre transferència de matèria per convecció natural. Aquesta teoria postula que per a la transferència de matèria des d'una fase a una altra (bombolla de gas a líquid) es forma una pel·lícula de líquid estàtica o amb moviment en flux laminar a la zona de contacte amb la fase gasosa. Mitjançant aquesta teoria es pot obtenir una relació de proporcionalitat entre el coeficient de transferència de matèria i la difusivitat d'oxigen en el medi líquid, D_{O_2} , que es defineix com un mòdul adimensional denominat *nombre de Sherwood* (Sh):

$$Sh = \frac{K_L d}{D_{O_2}} \quad \text{Eq. 2.30}$$

on d representa una distància característica del sistema, com ara el diàmetre de la bombolla de gas.

El *nombre de Sherwood* es pot relacionar amb les propietats físiques i les condicions d'operació del sistema mitjançant altres mòduls adimensionals. D'aquesta forma, s'obtenen expressions que permeten estimar el coeficient de transferència que són vàlides per a petites bombolles, gotes o partícules sòlides que cauen o ascendeixen en un medi fluid. Per a cèl·lules o flocs microbians pot emprar-se la següent expressió:

$$Sh = 2.0 + 0.31Gr^{1/3}Sc^{1/3} \quad \text{Eq. 2.31}$$

on Gr és el *nombre de Grashof* i Sc el *nombre de Schmidt*, cadascun d'aquests mòduls adimensionals es pot calcular a partir de:

$$Gr = \frac{d^3 \rho g \Delta \rho}{\mu^2} \quad \text{Eq. 2.32}$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_{O_2}} \quad \text{Eq. 2.33}$$

on ρ i μ representen la densitat i la viscositat del medi líquid, $\Delta\rho$ és la diferència de densitats entre la fase gasosa i la líquida, i g , l'acceleració de la gravetat.

Les principals variables que influeixen en l'àrea interfacial són el diàmetre de la bombolla, d ; la velocitat terminal de la bombolla, v_t , i el contingut en gasos o *hold-up* del bioreactor, H . Així, l'àrea interfacial pot aproximar-se mitjançant la següent expressió:

$$a = n_B A_B = H \frac{A_B}{v_B} = H \frac{6}{d} \quad \text{Eq. 2.34}$$

on n_B és el nombre de bombolles per unitat de volum de bioreactor, i A_B i v_B , l'àrea i volum de bombolla.

El diàmetre de les bombolles es pot relacionar, segons cada cas, amb el diàmetre de l'orifici d'eixida o amb les propietats físiques del líquid. El *hold-up* es pot estimar a partir del cabal volumètric de gas i de la velocitat terminal de cada bombolla. A més, en bibliografia es poden trobar diferents expressions per a l'estimació d'aquesta velocitat terminal, segons es tracte de bombolles aïllades o d'eixams de bombolles.

2.3.2.3 Correlacions empíriques

S'ha realitzat molta recerca per a quantificar la relació entre $k_L a$ i les condicions hidrodinàmiques i les propietats del fluid, com ara densitat, viscositat, difusivitat de l'oxigen, diàmetre de bombolla i velocitat del fluid, entre d'altres. Els resultats d'aquests estudis en forma de correlacions empíriques entre coeficient de transferència de matèria i les principals variables d'operació es poden trobar en bibliografia i, teòricament, aquestes correlacions permeten predir els coeficients de transferència d'acord amb una gran quantitat de dades experimentals. No obstant això, en la pràctica, la precisió d'aquestes correlacions empíriques per a sistemes biològics és en general molt pobra. Això és degut al fet que els estudis experimentals es fan amb aire i aigua pura, i la presència de diferents components i/o additius (substrats, productes, sals, agents tensioactius, etc.) afecta significativament el valor de $k_L a$. A més, resulta molt complex quantificar les correccions necessàries en funció de la composició del medi.

Per tant, encara que les correlacions publicades no haurien d'aplicar-se directament, hi ha un consens general quant a la forma de les equacions i la dependència entre $k_L a$ i les condicions d'operació dels bioreactors. Les que han tingut més èxit en la pràctica són equacions dimensionals com:

$$k_L a = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha v_g^\beta \quad \text{Eq. 2.35}$$

on P_g és la potència dissipada en l'agitació i V , el volum de líquid en el fermentador. v_g és la velocitat superficial de gas, que es defineix com la relació entre el cabal volumètric de gas i la secció del bioreactor. Els paràmetres α i β són pràcticament independents de les propietats del medi de fermentació. Aquests paràmetres normalment prenen valors menors a la unitat (entre 0,2 i 1,0), amb la qual cosa s'entén que l'estratègia d'augmentar el coeficient de transferència $k_L a$ a partir de l'augment de la potència d'agitació o del cabal de gas resulta progressivament menys eficient. Per altra banda, el paràmetre A varia significativament amb la composició i característiques del fluid.

Per a fluids no newtonians i especialment viscosos, se sol emprar una forma modificada de l'Eq. 2.35 que incorpora l'efecte de la viscositat en el coeficient de transferència:

$$k_L a = B \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha v_g^\beta \mu_a^{-\delta} \quad \text{Eq. 2.36}$$

on B es la constant, μ_a representa la viscositat aparent del fluid i δ és una constant que es troba en l'interval entre 0,5 i 1,3.

2.3.3 Variables que afecten la transferència de matèria

La taxa de transferència d'oxigen en els caldos de fermentació està influenciada per factors físics i químics que afecten k_L , a o bé la força impulsora ($C_{O^*} - C_O$). Com a regla general, el valor de k_L estarà fonamentalment relacionat amb els fenòmens que afecten les pel·lícules estacionàries a la vora de la interfície gas-líquid. L'àrea interfacial per unitat de volum, a , depèn essencialment de la grandària de les bombolles i, per últim, la força impulsora està relacionada (a més de la concentració d'oxigen en el bioreactor) amb el percentatge d'oxigen en la fase gasosa. En qualsevol cas, si es requereix una millora substancial en les taxes de transferència de massa, normalment és més productiu centrar-se en l'augment de l'àrea interfacial a . Com a referència, es pot dir que el valor de $k_L a$ sol estar en l'interval entre 0.02 a 0.25 s⁻¹ (70 a 900 h⁻¹). Heus ací algunes variables sobre les quals es pot actuar si es vol modificar, generalment per a augmentar, el coeficient $k_L a$:

- Disminuir la viscositat (dilució del medi, disminució de la grandària dels agregats cel·lulars, etc.).
- Augmentar la temperatura.
- Enriquir l'aire amb oxigen.
- Augmentar l'agitació.
- Modificar el difusor d'aire (tipus i grandària de les bombolles).
- Presència de certs components en el caldo de fermentació (agents tensioactius, sals, polímers, etc.).

2.3.3.1 Efecte de la viscositat

Una major viscositat fa que, en augmentar el fregament, la capa límit estacionària del líquid en la interfície gas-líquid siga més ampla, i augmente així la resistència a la transferència d'oxigen (disminució de k_L). Per altra banda, la reologia del fluid té un efecte significatiu sobre la mida de la bombolla, ja que un augment de la viscositat redueix l'efectivitat de l'impulsor i dificulta la distribució (disminució de a). Per tant, excepte en fluids de molt baixa viscositat, on aquests efectes són insignificants, $k_L a$ disminueix amb l'augment de la viscositat del líquid.

2.3.3.2 Efecte de la temperatura

L'augment de la temperatura disminueix la solubilitat de l'oxigen (C_{O^*}), de manera que redunda en la reducció de la força impulsora ($C_{O^*} - C_O$). No obstant això, per altra banda la temperatura incrementa la difusió d'oxigen en la pel·lícula líquida que envolta les bombolles, cosa que provoca un increment del coeficient de transferència k_L . L'efecte global de la temperatura en la transferència d'oxigen depèn de l'interval de treball. Per a temperatures entre 10 i 40°C, ço és, en l'interval d'operació de la majoria de les fermentacions industrials, un augment de la temperatura dona lloc a un augment de la taxa de transferència d'oxigen. Per sobre de 40°C, la solubilitat de l'oxigen disminueix de forma més significativa i afecta molt negativament la força impulsora i, per tant, la transferència d'oxigen.

2.3.3.3 Pressió parcial d'oxigen

La transferència d'oxigen depèn directament de la força impulsora ($C_o^* - C_o$) i la concentració d'equilibri C_o^* és funció directa de la pressió parcial d'oxigen en el gas des del qual es transfereix el medi. En conseqüència, l'ús d'aire enriquit amb oxigen, o directament oxigen pur, dona lloc a una millora substancial en la transferència. En aquest sentit, cal tenir en compte que, en determinats casos, el cultiu podria sofrir efectes inhibitoris degut a l'exposició a concentracions elevades d'oxigen. Una alternativa per a augmentar la solubilitat de l'oxigen en el medi consisteix a utilitzar una pressió total més elevada.

2.3.3.4 Velocitat d'agitació i cabal de gas

En sistemes agitats, la transferència de matèria des d'una fase gasosa a una de líquida presenta una forta relació amb la ruptura i dispersió de les bombolles i, en conseqüència, depèn de les velocitats relatives d'agitació i d'injecció de gas; l'equilibri entre aquests dos paràmetres determina si es produeix *flooding* (Figura 2.7 a) o una dispersió adient de gas en el volum de treball (Figura 2.7 c).

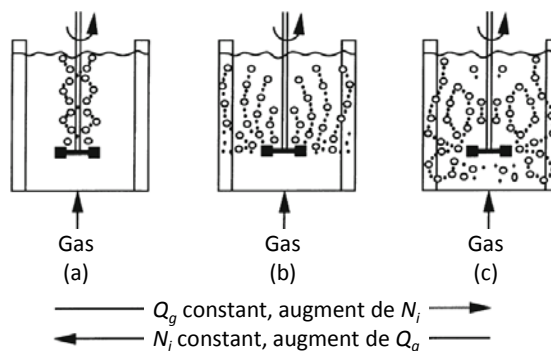


Figura 2.7. Models de distribució de les bombolles de gas en un tanc agitat en funció de la velocitat de gir de l'impulsor (N_i) i del cabal de gas (Q_g).

Normalment, l'augment de la velocitat d'agitació augmenta considerablement el coeficient k_L com a conseqüència del seu efecte sobre la capa de líquid estacionari en augmentar la turbulència del sistema. També té un efecte positiu en l'àrea interfacial, a , en contribuir a la ruptura i distribució més efectiva de les bombolles en el volum de reacció. Aquesta dependència amb $k_L a$ de la velocitat d'agitació no és tan important en fluids viscosos no newtonians. Per altra banda, l'augment del cabal de gas és una estratègia molt menys efectiva en la millora del $k_L a$. A més, en la majoria dels sistemes l'interval de treball està força limitat per la possibilitat de dur a terme el *flooding* de l'impulsor, que generaria una disminució ostensible de la transferència de matèria. Generalment, en la pràctica industrial se sol treballar per davall d'1,5 vvm (volum d'aire per volum de reacció per minut).

2.3.3.5 Efecte del difusor i les bombolles

La mida de les bombolles d'aire en fermentadors és un factor molt important en la transferència d'oxigen: per a un determinat volum de gas, es proporciona més àrea interfacial (a) si el gas es dispersa en moltes bombolles petites que en poques de grans. A més, les bombolles petites presenten menors velocitats d'ascens i, en conseqüència, es mantenen més temps en el volum de reacció, cosa que dona lloc a una elevada presència de gas en el reactor (ço és, *Hold-up* elevat). Per tant, un objectiu essencial en el disseny d'un sistema de bioreacció aeròbi consistirà a assolir un alt nivell de dispersió de gas en el volum de reacció.

Altrament, bombolles massa petites, amb diàmetres menors de 2 o 3 mm, tenen un efecte desfavorable sobre k_L a causa d'efectes superficials, amb la qual cosa resulta interessant evitar bombolles molt petites ($\ll 1\text{mm}$), especialment en caldos de fermentació molt viscosos.

El diàmetre de les bombolles que injecta un difusor en el bioreactor depèn en gran mesura de les característiques d'aquest difusor i, per tant, serà un paràmetre crític per al disseny de fermentadors sense agitació, com ara els *air-lifts*. No obstant això, en els sistemes agitats, el disseny del difusor i la mecànica de la formació de bombolles tenen una importància secundària en comparació amb els efectes de l'impulsor. Els equips per a l'aeració a escala industrial es poden classificar en:

- Difusors de bombolla petita
- Difusors de bombolla gran
- Injector de xoc
- Injector de raig

El disseny dels difusors per a l'aeració està optimitzat per tal de produir una gran quantitat de bombolles en fer passar el corrent d'aire que arriba des d'un sistema de compressió. Normalment, els difusors es classifiquen d'acord amb la grandària de la bombolla: petita o gran. Els difusors de bombolla petita solen tenir forma de tub o placa (Figura 2.8). Pel que fa als materials, s'empren difusors tèxtils, ceràmics o de membrana elàstica. Aquests darrers són els que s'estan imposant majoritàriament en l'actualitat. Els difusors de membrana elàstica (Figura 2.9) consten d'un suport de material plàstic rígid sobre el qual s'ajusta una membrana elàstica amb orificis molt fins, de forma que genera bombolles amb una superfície específica elevada que proporciona un bon contacte aire-aigua i permet assolir transferències d'oxigen elevades. El gran avantatge d'aquest tipus de difusor és que dificulta l'embossament dels orificis per formació de biofilm a causa de les propietats elàstiques del material.

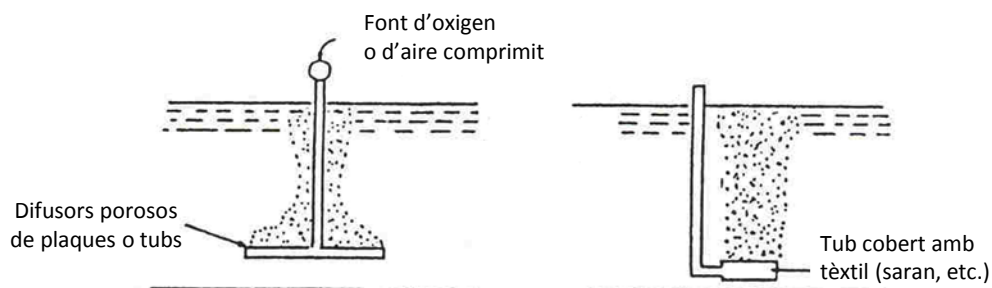


Figura 2.8. Difusors de bombolla petita ceràmics i tèxtils.

Els difusors de bombolla gran (Figura 2.10) empren tubs especials amb un disseny més o menys sofisticat per tal que es formen les bombolles. Encara que aquests dispositius donen lloc a uns rendiments menors en la transferència a causa de la menor superfície específica de les bombolles, el seu cost d'impulsió és molt més reduït com a conseqüència de la menor resistència a la circulació del gas.

Els difusors de xoc i de raig (Figura 2.11) es basen en la mescla d'aire a pressió amb el líquid, de forma que generen transferències elevades d'oxigen. El sistema de raig mescla el líquid en un punt de la conducció on hi ha una reducció del diàmetre, de manera que es produeix un gran turbulència i es facilita la mescla dels dos fluids. Per altra banda, el sistema de xoc consisteix en un orifici relativament gran sobre el qual se situa un element que deixa

escapar aire a pressió. El líquid ix a través d'un orifici oposat a l'eixida de l'aire, xoca contra l'element d'injecció i genera petites bombolles de gas.

En els reactors agitats, l'equipament d'aeració es complementa amb els agitadors, tal com s'estudiarà en la propera secció del present tema.

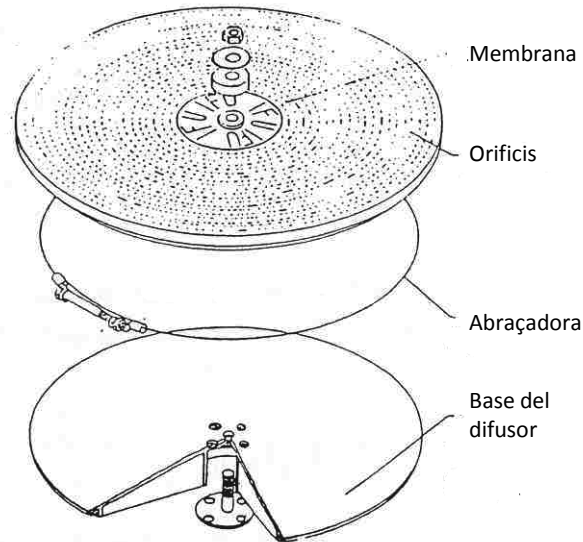


Figura 2.9. Difusor de membrana.

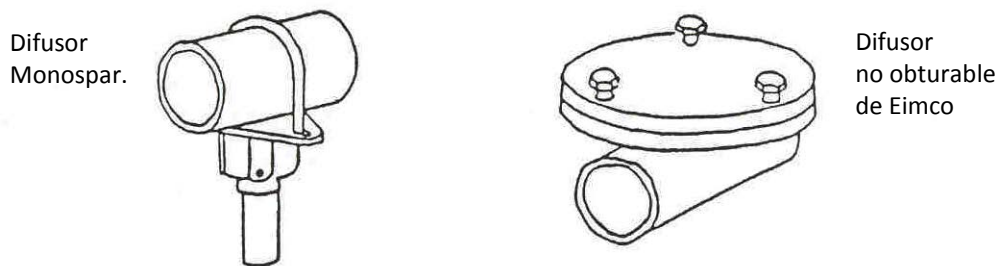


Figura 2.10. Difusors de bombolla gran.

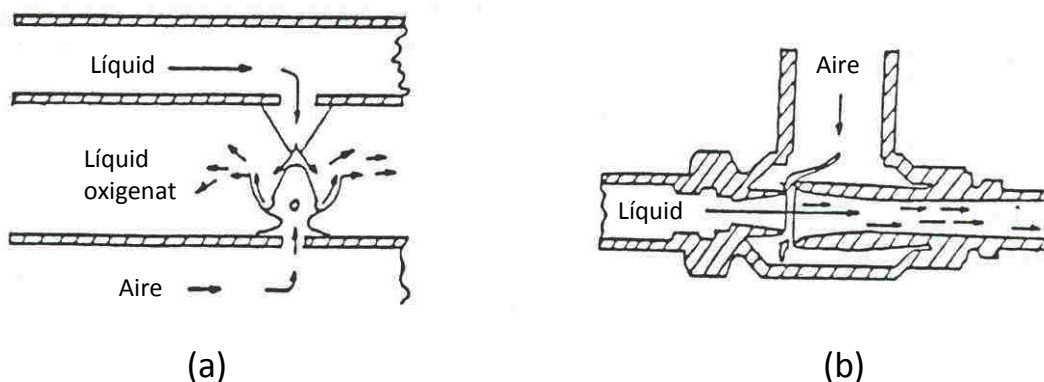


Figura 2.11. Difusors especials: (a) de xoc; (b) de raig.

2.3.3.6 Salinitat del medi i coalescència de bombolles

En un fermentador industrial, cal evitar la unió de bombolles petites amb altres de més grans (coalescència) a fi d'evitar la reducció de l'àrea interfacial i la disminució del temps de manteniment del gas en el bioreactor. La coalescència depèn principalment de les propietats

del líquid. En líquids coalescents, com ara l'aigua pura, una gran fracció de col·lisions de bombolles provoca la formació de bombolles més grans. En canvi, en els líquids no coalescents, les bombolles que xoquen tendeixen a rebotar entre elles a causa dels efectes de la tensió superficial. La presència de sals i ions evita la coalescència; per tant, els medis de fermentació no solen ser coalescents fins a cert punt. Aquest és un avantatge des del punt de vista de la transferència d'oxigen, ja que l'addició d'ions a l'aigua redueix notablement la mida mitjana de les bombolles (l'àrea d'interfície en un medi amb sals pot ser fins a 10 vegades superior en referència a l'aigua pura) i augmenta el temps de permanència del gas.

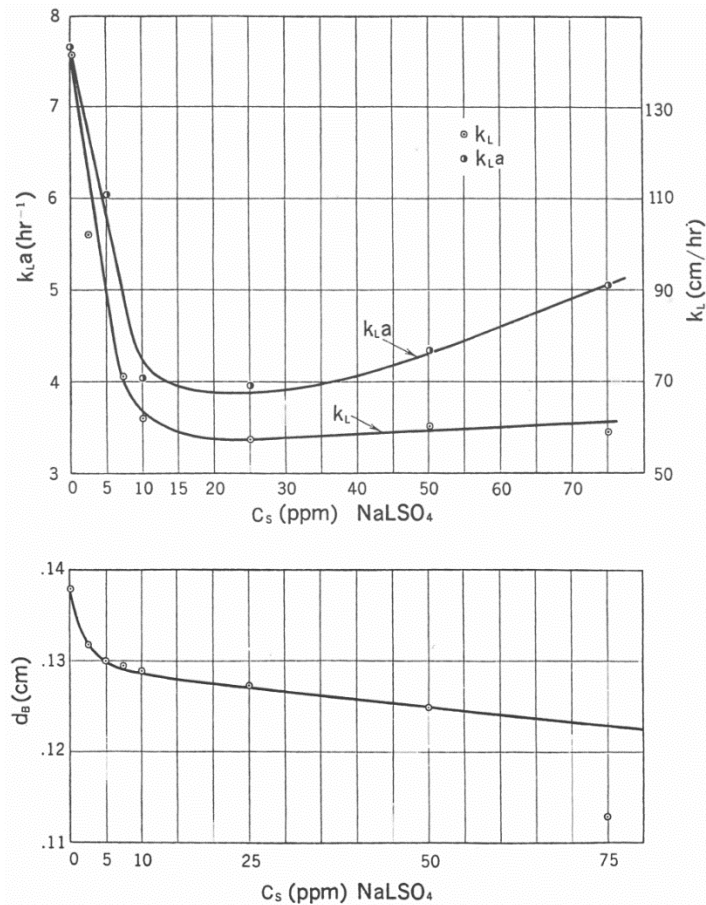


Figura 2.12. Efecte de l'addició de lauril fosfat sòdic sobre: k_{La} , k_L i el diàmetre de bombolla (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*).

2.3.3.7 Agents tensioactius i antiespumants

La majoria dels cultius cel·lulars generen agents productors i estabilitzadors d'escumes. Per tant, l'acumulació d'escuma en fermentadors és molt comuna, especialment en sistemes aerobis. El control d'escumes té una gran importància en el disseny d'un bioreactor industrial, atès que aquestes poden generar diversos problemes de funcionament: entrada de contaminants per desbordament per la part superior; bloqueig de les línies de sortida de gasos; les condicions en l'escuma no són favorables per a l'activitat metabòlica i per tant la seua presència suposa una pèrdua efectiva del volum de reacció relacionada amb el medi i biocatalitzador atrapats en l'escuma.

L'addició d'agents antiescumants sol ser el mètode més habitual per a reduir l'acumulació d'escuma. L'inconvenient d'aquests productes està relacionat amb el seu efecte sobre la química superficial de les bombolles i la seua tendència a unir-se. Atès que la majoria

d'agents antiescumants són substàncies que redueixen la tensió superficial, ocasionen una reducció del diàmetre mitjà de les bombolles, que dona lloc a valors més alts d'àrea d'interfase per volum (a). No obstant això, l'efecte sobre la interfície d'aquests productes genera una resistència addicional a la transferència de matèria que redueix el valor de k_L . En la majoria de casos, la disminució de k_L és major que l'augment de a , de manera que es produeix una disminució global de k_{LA} que en alguns casos pot donar lloc a una important disminució de la transferència d'oxigen en un factor d'entre 5 a 10. La Figura 2.12 posa de manifest com l'addició d'un tensioactiu, lauril fosfat sòdic, afecta el valor del coeficient de transferència de matèria i la grandària de les bombolles.

Una alternativa interessant per a evitar efectes perjudicials sobre el coeficient volumètric k_{LA} consisteix en l'ús de mètodes mecànics per al trencament de les escumes (mitjançant elements giratoris instal·lats en la part superior del fermentador), que poden ser útils quan la formació d'escuma és moderada.

2.3.3.8 Presència de material cel·lular i macromolècules

Les cèl·lules, macromolècules (proteïnes, etc.) i petites partícules tenen certa tendència a acumular-se en la interfase gas-líquid en sistemes amb aeració, de manera que donen lloc a un augment de la resistència a la transferència de matèria (reducció de k_L). Per altra banda, també contribueixen a la reducció de la coalescència de bombolles, que augmenta la superfície específica a . En qualsevol cas, l'efecte quantitatiu del bloqueig superficial serà molt específic de cada sistema particular.

2.4 AGITACIÓ: TRANSFERÈNCIA DE MATÈRIA PER CONVECCIÓ FORÇADA

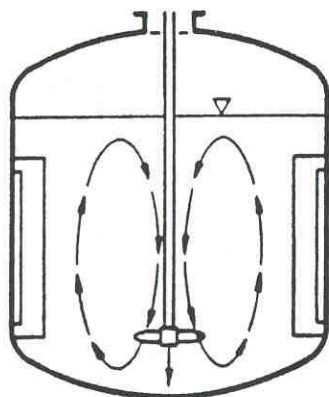
L'agitació mecànica mitjançant convecció forçada provoca un augment de la transferència de matèria respecte a la que es produeix per convecció natural, és a dir, la que va associada a la diferència de densitats. D'aquesta manera, es minimitzen les resistències a la transferència de matèria i millora la velocitat global del procés. A més, presenta altres efectes importants:

- La turbulència creada prop de l'agitador produeix la ruptura i la dispersió de les bombolles d'aire per tot el volum de reacció, que dona lloc a un augment en la transferència d'oxigen.
- En fermentacions amb presència de sòlids o altres fases líquides amb tendència a decantar, la mescla mecànica produeix una dispersió uniforme.
- En fermentacions molt viscoses, únicament es pot aconseguir el grau de mescla adequat amb agitació mecànica.
- En cas de ser necessari, dispersa líquids immiscibles per a formar emulsió o suspensió de gotes fines.
- La grandària màxima dels agregats bacterians, miceliars, etc., pot disminuir-se per agitació, cosa que millora l'homogeneïtzació de la fase líquida. D'altra banda, és convenient no oblidar que una agitació massa vigorosa pot danyar els sistemes enzimàtics cel·lulars i produir una disminució del rendiment.

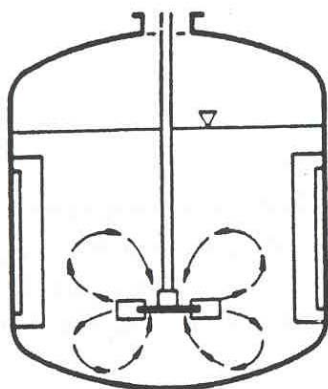
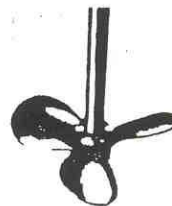
El consum energètic d'un sistema d'agitació mecànica sol ser bastant important, amb una potència que sol estar normalment entre 0,8-3 kW/m³. En conseqüència, el disseny resultarà molt important per la seua relació amb l'economia del procés. En aquest apartat es presenten les bases per a dur a terme el disseny de l'agitació mecànica de bioreactors, per la qual cosa caldrà tenir en consideració els sistemes amb i sense aeració.

2.4.1 Models de flux en fermentadors agitats

Quant a l'equipament industrial, hi ha una gran varietat de tipus i dissenys d'impulsors, depenent de les necessitats, objectius i propietats dels materials implicats en l'operació. No obstant això, existeixen dos tipus bàsics de sistemes d'agitació que donen lloc a dos models de flux totalment contraposats: radials i axials. La majoria d'impulsors se sol situar entre aquestes dues situacions extremes. En la Figura 2.13 es mostren els patrons de flux dels dos tipus d'agitadors.



(a) Impulsor de flux axial: hèlix marina.



(b) Impulsor de flux radial: turbina d'alep pla (turbina *Rushton*).

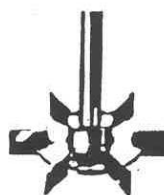


Figura 2.13. Patrons de flux segons impulsor instal·lat en el bioreactor.

La producció de vòrtex en els líquids ha de limitar-se en tots els casos. Per a això, en els bioreactors s'instal·len deflectors constituïts per làmines verticals unides la paret del tanc que redueixen els vòrtex del líquid. Normalment és suficient amb 4 deflectors equidistants amb una amplària que sol ser normalment del 10% del diàmetre del bioreactor.

Els agitadors radials impulsen el fluid en direcció transversal a les parets del tanc i generen una major turbulència. Són adequats per a dispersions, com per exemple de gasos en líquids, i per tant s'empren per a fermentacions aeròbies. L'agitador de turbina representa el tipus característic de flux radial, està constituït per un disc perpendicular a l'eix de gir en la perifèria del qual se situen una sèrie d'aletes. Es tracta del rodet més utilitzat en les fermentacions industrials.

Els agitadors axials generen un flux paral·lel a l'eix de l'agitador i proporcionen una major velocitat de circulació del líquid. S'utilitzen principalment per a la mescla de líquids i per a la suspensió de sòlids en líquids. Són els impulsors d'ús més comú en bioprocessos anaerobis. L'alta velocitat de circulació fa que en sistemes amb aeració disminuïska el temps de retenció

de les bombolles en el bioreactor, per la qual cosa no estan recomanats en absolut per a fermentacions aeròbiques. L'agitador d'hèlix marina amb tres àleps representa el tipus característic d'impulsor de flux axial.

2.4.2 Tipus de rodets per a l'agitació de bioreactors

Hi ha molts tipus diferents d'impulsors disponibles per a aplicacions de mescla. A la Figura 2.14 es mostren els més utilitzats.

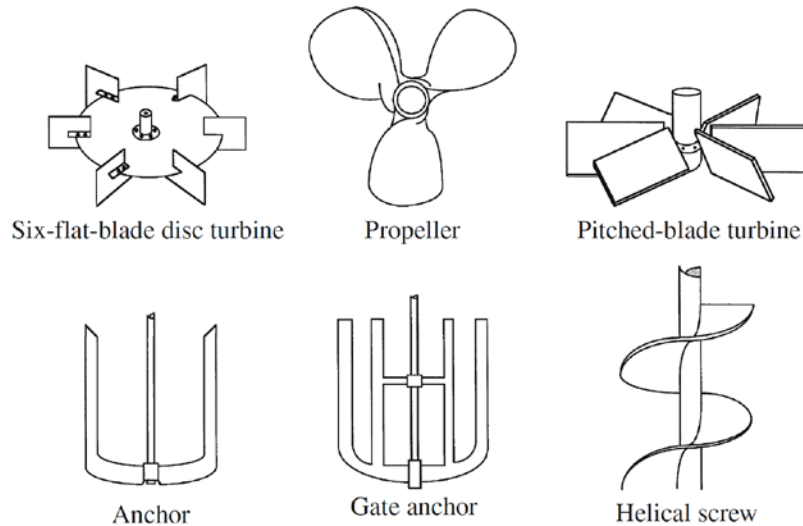


Figura 2.14. Rodets per agitació de fermentadors.

(P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*).

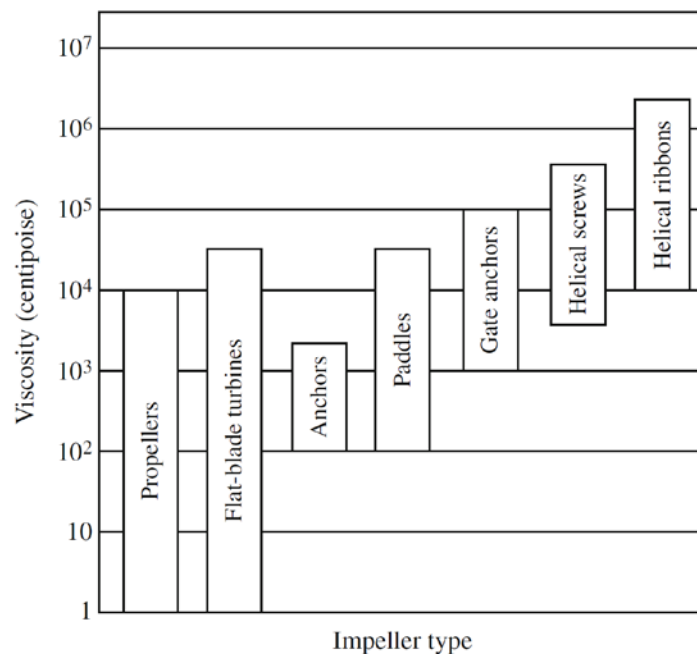


Figura 2.15. Interval de viscositat per a diferents rodets d'agitació.

(P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*).

L'elecció del rodet depèn de diversos factors, principalment de la viscositat del líquid, de la necessitat de turbulència i de la velocitat. En la Figura 2.15 es mostren els rodets recomanats segons l'interval de viscositat de treball.

Normalment, l'agitació dels fermentadors es realitza mitjançant turbines o hèlixs a velocitats relativament altes per a generar, a la punta de l'impulsor, velocitats de l'ordre de 3 m/s. Aquests rodets es poden emprar per a la majoria de caldos de fermentació tenint en compte que poden treballar amb líquids amb viscositats entre 1 i 10^4 cp (10^{-3} i 10 Pa·s).

Per a fluids molt viscosos, a voltes resulta impossible, per raons mecàniques o econòmiques, fer girar el rodet prou ràpid per a generar la turbulència necessària; en aquests casos es fan servir dissenys especials com els d'ànchora, d'ànchora de reixa i agitadors helicoidals. Tots aquests són agitadors grans que treballen a velocitat baixa (5-20 rpm) i a distàncies molt properes a les parets del fermentador. Cal tenir en compte que aquests agitadors, encara que només es fan servir per a casos especials en bioreactors, poden ser utilitzats per a altres aplicacions de mesclat en bioprocessos.

2.4.3 Requeriments de potència per agitació

2.4.3.1 Fluids newtonians sense aeració

Les necessitats de potència d'un fermentador poden caracteritzar-se mitjançant un mòdul adimensional denominat **número de potència** N_p . El significat físic d'aquest mòdul està relacionat amb el quocient entre la força exercida per l'agitador (relacionada amb la potència d'agitació) i la força d'inèrcia del fluid, és a dir:

$$N_p = \frac{\text{Força externa}}{\text{Força d'inèrcia}} = \frac{P}{N_i^3 D_i^5 \rho} \quad \text{Eq. 2.37}$$

on P és la potència absorbida per sistema en el procés d'agitació, N_i la velocitat de rotació de l'agitador (rps), D_i el diàmetre de l'agitador i ρ la densitat del fluid.

Per altra banda, el moviment dels fluids en un bioreactor agitat es pot caracteritzar mitjançant el mòdul adimensional de Reynolds, que en la seua definició per a tancs agitats ve donat per:

$$Re = \frac{\text{Força d'inèrcia}}{\text{Força viscosa}} = \frac{N_i D_i^2 \rho}{\mu} \quad \text{Eq. 2.38}$$

on de μ és la viscositat del líquid.

Una volta quantificada de forma adimensional, la potència absorbida per un sistema dependrà fonamentalment de tres variables: la geometria del bioreactor, el tipus de rodet utilitzat i el règim de circulació del fluid. Així, si es consideren sistemes geomètricament semblants (és a dir, amb proporcions idèntiques entre les dimensions), per a cada tipus de rodet podrà obtenir-se una correlació entre N_p i Re (Corba de potència). Aquesta relació es mostra en forma gràfica en la Figura 2.16 per als agitadors d'hèlix, de paleta plana i de turbina d'àlep pla (turbina *Rushton*) si es considera que el bioreactor té una geometria estàndard.

En la Figura 2.17 es mostren les relacions entre les dimensions de la geometria que s'ha establert com a estàndard. Lògicament, per a geometries diferents, la corba de potència presentaria una altra configuració.

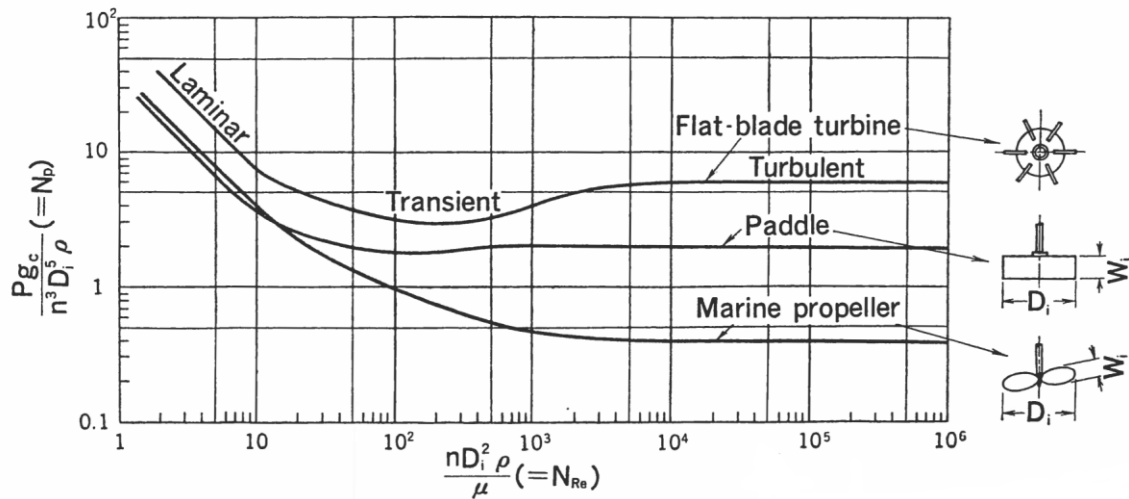
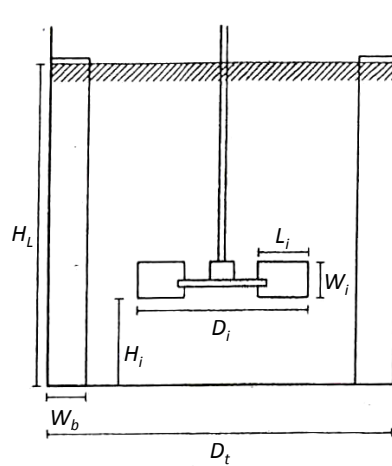


Figura 2.16. Necessitats de potència per a diferents tipus d'agitador. (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*).



Tipus de rodet	D_t/D_i	H_L/D_i	L_i/D_t	W_i/D_i	H_i/D_i	N_b	W_b/D_t
Turbina de àlep pla	3,0	3,0	1/4	1/5	1,0	4	1/10
De paleta	3,0	3,0	--	1/4	1,0	4	1/10
Hèlix marina	3,0	3,0	Pitch= D_i		1,0	4	1/10

N_b : núm. de deflectors

Figura 2.17. Relacions geomètriques estàndard per a un bioreactor de tanc agitad. (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*).

De les relacions gràfiques que es mostren en la corba de potència (Figura 2.16) es poden derivar equacions senzilles segons el règim de circulació del fluid.

- En la regió de flux laminar ($Re < 10$), el nombre de potència és inversament proporcional al mòdul de Reynolds, per tant:

$$P = ctt \mu N_i^2 D_i^3 \tag{Eq. 2.39}$$

en aquestes condicions, la potència d'agitació és proporcional a la viscositat però independent de la densitat del fluid.

- En la regió turbulenta ($Re > 10^4$), N_P és constant i independent de Re , de manera que la potència d'agitació resulta fortament dependent del diàmetre (5a potència), dependent de la densitat, però independent de la viscositat:

$$P = ctt' \rho N_i^3 D_i^5 \tag{Eq. 2.40}$$

en aquestes condicions, la constant de proporcionalitat serà igual al nombre de potència ($ctt' = N_P$). Com es pot observar, petits canvis en la grandària del rodet tenen un gran efecte amb la potència requerida, en règim turbulent. Un augment del 10% en el diàmetre del rodet augmenta la potència necessària en més d'un 60%, mentre que un augment del 10% en la velocitat de gir només augmenta la potència un 30%.

Les constants de proporcionalitat varien en funció del tipus d'agitador. Segons la geometria del rodet es fa més axial, la potència requerida disminueix. Per a règim turbulent, els valors empírics de la constant (és a dir el valor de N_P) són: **6,3 per a la turbina d'alep pla (Rushton)**, **1,7 per a la paleta** i **0,32 per a l'hèlix marina**.

Els agitadors helicoidals presenten un comportament totalment diferent als anteriors, tal com es desprèn de la corresponent corba de potència (Figura 2.18).

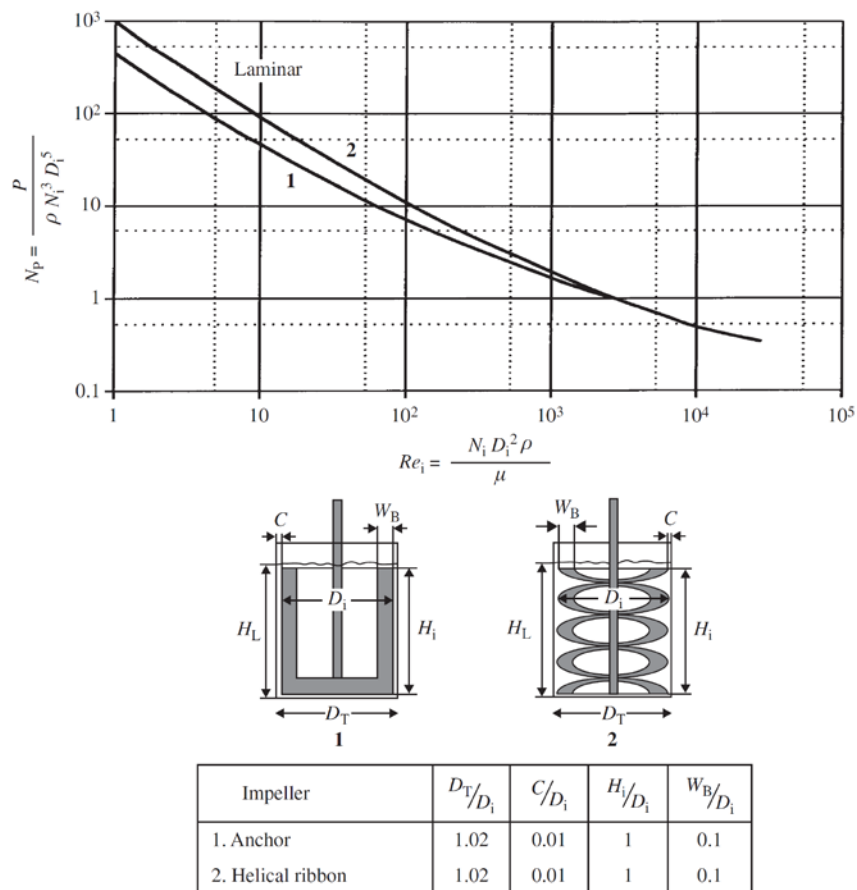


Figura 2.18. Correlació entre el número de potència i el Reynolds per a agitadors helicoidals. (P.M. Doran, *Bioprocess engineering principles*).

En reactors de grandària considerable, és freqüent l'ús de més d'un agitador per eix per tal de proporcionar la potència necessària. El nombre d'agitadors per eix modifica el nombre de potència. El valor de N_P per a 2 i 3 rodets per eix es pot aproximar al doble i triple del N_P per a un rodet únic, sempre que s'adopti una relació L_i/D_i en l'interval 1-2, on L_i és la

distància entre agitadors. Per altra banda, quan hi ha una desviació de les relacions estàndards, es pot aplicar un factor corrector, f_c , que ajusta la desviació de la potència absorbida respecte a la geometria estàndard:

$$f_c = \sqrt{\frac{(D_t^*/D_i^*)(H_L^*/D_i^*)}{(D_t/D_i)(H_L/D_i)}} \quad \text{Eq. 2.41}$$

on D_t^*/D_i^* y H_L^*/D_i^* representen les relacions entre el diàmetre del bioreactor (D_t^*) i el nivell d'alçada del medi de reacció (H_L^*) respecte al diàmetre del agitador (D_i^*) en el sistema real que s'aparta de la geometria estàndard. En el denominador es consideren les mateixes relacions per a un sistema estàndard i, per tant, tal com es desprèn de la Figura 2.17, $D_t/D_i = 3$ y $H_L/D_i = 3$.

2.4.3.2 Fluids no newtonians sense aeració

La quantificació de la potència absorbida en fluids no newtonians és molt més complexa ja que la viscositat pot variar en el transcurs de la fermentació i afectar l'absorció de potència i la mescla. A més, amb aquests fluids moltes vegades no és possible assolir turbulències totalment desenvolupades en fluids molt viscosos, amb la qual cosa N_p sempre dependrà de Re . Per altra banda cal afegir que, com que la viscositat dels líquids no newtonians depèn de les condicions de cisalla aplicades al fluid, serà necessari calcular de nou Re per a determinar la potència absorbida. Algunes correlacions empíriques s'han fet servir a partir del nombre de Reynolds basat en la viscositat aparent, μ_a :

$$Re = \frac{N_i D_i^2 \rho}{\mu_a} \quad \text{Eq. 2.42}$$

d'aquesta manera, es pot utilitzar el procediment de les corbes de potència descrit més amunt per als fluids newtonians. Així, si la viscositat aparent del fluid segueix la llei exponencial:

$$Re = \frac{N_i D_i^2 \rho}{K \gamma^{n-1}} \quad \text{Eq. 2.43}$$

on n és l'índex de comportament del flux i K l'índex de consistència. Un problema associat a l'aplicació de l'Eq. 2.43 és l'avaluació de la velocitat de cisalla en el sistema (γ). Com que la majoria de fluids no newtonians manipulats en biotecnologia són pseudoplàstics, la viscositat aparent depèn (disminueix) amb l'augment de la velocitat de cisalla. En tancs agitats la velocitat de cisalla mitjana (γ_m) depèn linealment de la velocitat de gir de l'agitador (N_i):

$$\gamma_m = k N_i \quad \text{Eq. 2.44}$$

on k és una constant que depèn del tipus de rodet (Taula 2.6). Si es substitueix aquest valor mitjà empíric (Eq. 2.44) en l'Eq. 2.43, s'obté una aproximació del mòdul de Reynolds apropiada per a fluids pseudoplàstics:

$$Re = \frac{N_i^{2-n} D_i^2 \rho}{K k^{n-1}} \quad \text{Eq. 2.45}$$

Amb aquesta aproximació, els valors de N_p són pràcticament idèntics als dels fluids newtonians per a Re per davall de 10 i per damunt de 200. En l'interval entre tots dos valors, els fluids pseudoplàstics consumeixen menys energia que els newtonians. No obstant això, hi ha diverses dificultats a l'hora de l'aplicació pràctica d'aquesta aproximació, ja que els patrons de flux en fluids pseudoplàstics i newtonians difereixen significativament: encara que hi haja una alta turbulència prop de l'impulsor en sistemes pseudoplàstics, el si del líquid

es pot moure molt lentament i consumir relativament poca potència. Una altre problema afegit és que els paràmetres no newtonians K i n , i per tant μ_a , poden variar substancialment durant el transcurs de la fermentació.

Taula 2.6. Valors empírics de la constant k en l'Eq. 2.44.

Rodet	k
Turbina <i>Rushton</i>	10-13
Hèlix	10
Àncora	20-25
Cinta helicoidal	30

(S. Nagata, *Mixing: Principles and applications*).

2.4.3.3 Sistemes amb aeració

L'aeració del medi de fermentació provoca una disminució en les necessitats de potència, ja que la densitat i la viscositat de la fase líquida descendeixen amb l'aeració, sobretot al voltant de l'agitador. Aquesta disminució, que pot arribar fins i tot per sota del 50%, dependrà de la forma com interaccionen les bombolles i l'agitador. Per exemple, l'absorció de potència per agitació no es modificarà si la bombolla que ascendeix pel líquid en el reactor agitad no es troba de forma efectiva amb l'agitador. Aquesta disminució de la potència necessària per a sistemes amb aeració (relació P_g/P , potència amb aeració respecte la potència sense) es pot relacionar amb el nombre d'aeració N_a . Aquest mòdul és un paràmetre adimensional que quantifica la relació entre la velocitat superficial del gas respecte de la velocitat a la perifèria de l'impulsor:

$$N_a = \frac{\text{Velocitat superficial del gas}}{\text{Velocitat a l'extrem de l'agitador}} = \frac{Q_g/D_i^2}{N_i D_i} = \frac{Q_g}{N_i D_i^3} \quad \text{Eq. 2.46}$$

on Q_g és el cabal de gas subministrat, N_i , la velocitat de rotació de l'agitador (rps) i D_i , el diàmetre de l'agitador. Aquest nombre representa en certa manera el grau de dispersió de les bombolles al voltant de l'impulsor i per tot el tanc. Com que els canvis en el comportament hidrodinàmic per la injecció de gasos no són encara suficientment coneguts, resulta especialment difícil obtenir una predicció precisa del consum de potència. De forma que hi ha diverses aproximacions d'acord amb estudis de diferents autors. En la Figura 2.19 es mostra la relació P_g/P empírica en funció del nombre d'aeració (N_a) per a diferents tipus de turbines. Aquesta correlació és pobre i presenta limitacions, ja que no es pot utilitzar quan les variables de operació (diàmetre, velocitat de l'agitador i cabal d'aire) presenten una gran variació. Per altra banda, la següent equació, desenvolupada per Michel & Miller, ha estat aplicada a fluids newtonians i no newtonians per a una ampli interval de dimensions (100-40.000 L):

$$P_g = C \left(\frac{P^2 N_i D_i^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45} \quad \text{Eq. 2.47}$$

en aquest cas P representa la potència d'agitació sense aeració i P_g , la potència d'agitació amb injecció de gas. C és una constant que depèn de la geometria del fermentador. Aquesta equació es aplicable per a medis amb $\rho = 0,8-1,65 \text{ kg/m}^3$ i $\mu = 0,9-100 \text{ cp}$. En la Figura 2.20 es mostra la correlació de Michel & Miller en forma gràfica.

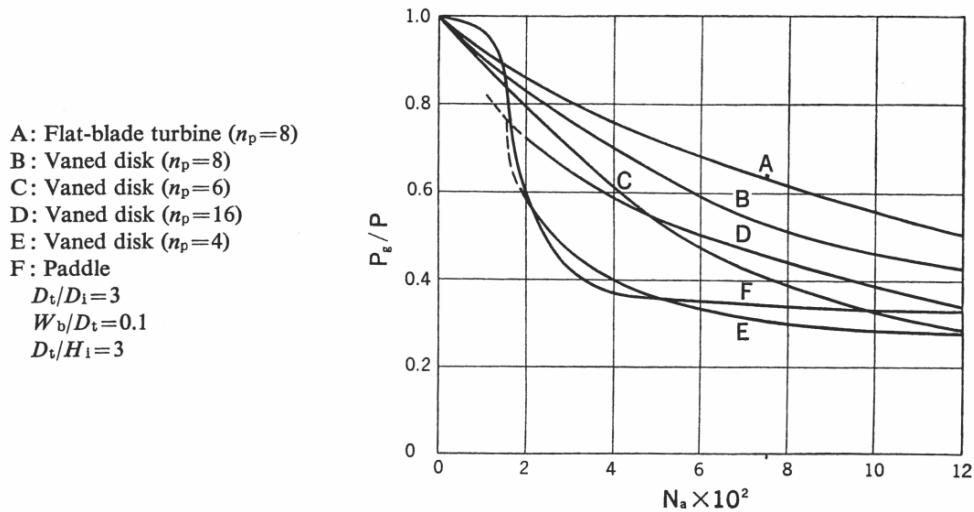


Figura 2.19. Disminució de la potència absorbida amb la injecció de gas en funció del nombre d'aeració per a diferents tipus d'agitadors. (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*).

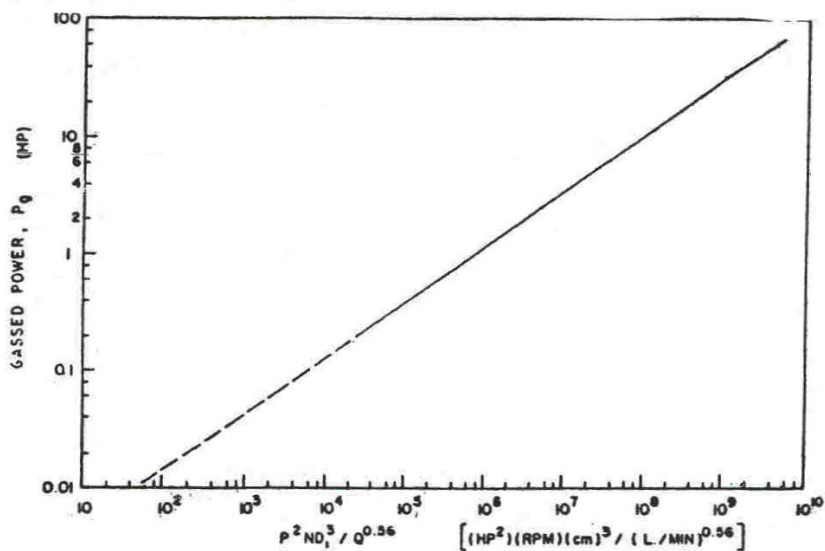


Figura 2.20. Correlació de Michel & Miller per a l'estimació de la potència absorbida en bioreactors amb aeració.

Una alternativa a la determinació del nombre d'aeració consisteix en l'ús del paràmetre *hold-up*, H . Si se suposa que el líquid conté una dispersió uniforme de bombolles de gas, el sistema es comportarà com un líquid amb una densitat ρ_g menor que la densitat del líquid ρ , i es pot aproximar:

$$\rho_g = (1 - H)\rho \tag{Eq. 2.48}$$

de forma que a partir de la definició del nombre de potència:

$$N_P = \frac{P_g}{N_i^3 D_i^5 \rho_g} \tag{Eq. 2.49}$$

on P_g és la potència d'agitació per al sistema amb injecció de gas. Com que en règim turbulent N_p és constant i independent de Re per a cada tipus de rodet, es poden relacionar totes dues potències amb les corresponents densitats i, en conseqüència, amb el valor de H :

$$\frac{P_g}{P} = \frac{\rho_g}{\rho} = (1 - H) \quad \text{Eq. 2.50}$$

De forma que aquesta equació ens proporciona un mètode per a estimar l'efecte del gas en la disminució de la potència absorbida pel fluid. És evident que la relació anterior estarà afectada per qualsevol variable que altere el *hold-up*, H , com ara: velocitat de rotació de l'agitador, cabal de gas, tipus de rodet o difusor, grandària de la bombolla, viscositat del fluid, sòlids en suspensió, etc.

En sistemes amb aeració, el rodet que més s'utilitza en fermentacions industrials és la turbina d'àlep pla (turbina *Rushton*), ja que resulta especialment efectiva en la dispersió de gasos. No obstant això, resulta especialment important conèixer l'interval de treball quant a cabal de gas i velocitat de gir per tal que el sistema funcione adequadament. Si el cabal d'aire és massa elevat (Figura 2.7a), l'agitador resulta inundat pel gas (*flooding*), de forma que no hi ha distribució pel volum del fermentador i, en conseqüència, la transferència de matèria disminuirà de forma alarmant. Si es disminueix el cabal de gas (o s'augmenta la velocitat de gir de l'agitador) a valors més favorables, es produirà una distribució adient del gas per tot el fermentador (Figura 2.7b). En una situació intermèdia (Figura 2.7c), l'agitador estarà sobrecarregat: només serà capaç de distribuir les bombolles per sobre del rodet. S'han desenvolupat correlacions per tal de preveure les condicions d'operació sota les quals es produeix la sobrecàrrega de l'agitador i/o la completa distribució per al cas de la turbina *Rushton*, considerant que es tracta d'un punt d'elevada importància. Les relacions s'han desenvolupat utilitzant el nombre d'aeració (N_a) i el nombre de Froude, Fr :

$$Fr = \frac{N_i^2 D_i}{g} \quad \text{Eq. 2.51}$$

on g representa l'acceleració de la gravetat. N_i i D_i , com d'habitud, la velocitat de gir i el diàmetre de l'agitador, respectivament. Conceptualment, Fr representa la relació entre forces d'inèrcia del sistema i les gravitacionals (o de flotació, en aquest cas). La transició de la situació de *flooding* a la de sobrecàrrega es pot estimar a partir de la següent equació:

$$N_a = 30 \left(\frac{D_i}{D_t} \right)^{3.5} Fr \quad \text{Eq. 2.52}$$

Les condicions per a assolir una completa dispersió del gas mitjançant una turbina *Rushton* estan representades per l'equació següent:

$$N_a = 0.2 \left(\frac{D_i}{D_t} \right)^{0.5} Fr^{0.5} \quad \text{Eq. 2.53}$$

Les dues equacions anteriors (Eq. 2.52 i Eq. 2.53) es poden aplicar a fluids de viscositat no massa elevada. Aquestes equacions mostren que un augment del 10% en el diàmetre de l'agitador possibilita un augment del 100% en el cabal d'aire sense que es produïska *flooding* i del 50% per a mantenir una dispersió completa. La dependència amb la velocitat de gir de l'agitador no és tan important: un 10% d'increment en N_i permet un increment del Q_g per al *flooding* i per a la completa dispersió del 30% i 20%, respectivament.

2.4.4 Suspensió de sòlids

Els bioreactors utilitzats per al cultiu cel·lular contenen sòlids de biomassa de diferents dimensions. Els microorganismes, com ara bacteris unicel·lulars i llevats, són petits i finament dividits; altres cèl·lules com els micelis i les cèl·lules vegetals formen agregats o grups macroscòpics en funció de les condicions de cultiu. Com que les cèl·lules contenen un percentatge d'aigua elevat, la diferència de densitat entre la fase sòlida i el líquid de suspensió generalment és molt reduïda. Tanmateix, en alguns bioprocessos, les cèl·lules estan immobilitzades sobre o dins de matrius sòlides de densitat variable.

Una de les funcions de l'agitació en els fermentadors és mantenir el biocatalitzador en suspensió. L'acumulació de la biomassa activa al fons del tanc és totalment indesitjable ja que les cèl·lules tindran poca accessibilitat als nutrients disponibles en el si del medi de fermentació i, en conseqüència, la transferència de matèria limitarà el procés. Per tant, és important saber quines condicions operatives es requereixen per a mantenir una suspensió completa dels sòlids en tancs agitats.

Un criteri habitual per a definir que una suspensió de sòlids és adient consisteix en el fet que cap partícula no es mantinga immòbil en la part inferior del tanc més d'1-2 segons. Aplicant aquest criteri, l'equació de Zwietering generalment s'accepta com la millor correlació empírica per a quantificar N_{JS} , la velocitat d'agitació mínima requerida per a mantenir una suspensió completa dels sòlids en absència d'injecció de gas.

$$N_{JS} = \frac{S v_L^{0.1} D_p^{0.2} [g(\rho_p - \rho_L)/\rho_L]^{0.45} x^{0.13}}{D_i^{0.85}} \quad \text{Eq. 2.54}$$

- on: S , paràmetre que depèn del tipus d'agitador i de la geometria del bioreactor.
 v_L (μ_L/ρ_L), viscositat cinemàtica del líquid (m^2/s).
 D_p , diàmetre de les partícules sòlides (m).
 g , acceleració de la gravetat ($9,81 m/s^2$).
 ρ_p , densitat de les partícules (kg/m^3).
 ρ_L , densitat del líquid (kg/m^3).
 x , percentatge màssic de partícules en la suspensió (s.u.).
 D_i , diàmetre de l'agitador (m).

Taula 2.7. Valors empírics del paràmetre geomètric S en Eq. 2.54.

Rodet	D_i/D_t	H_i/D_t	S
Turbina Rushton	0,25	0,25	12
	0,33	0,17	5,8
	0,33	0,25	6,7
	0,33	0,33	7,4
	0,33	0,50	8,0
	0,50	0,25	4,25
	0,50	0,17	3,9
Hèlix marina	0,33	0,25	6,6

(S. Nagata, *Mixing: Principles and applications*).

Aquesta equació ha estat usada extensament en la pràctica per a diferents sistemes i medis de cultiu. Els exponents en l'Eq. 2.54 són completament independents de la grandària del fermentador, del tipus de rodets i de les relacions geomètriques D_i/D_t i H_i/D_t , ja que aquests

factors geomètrics es tenen en consideració en el valor de S . La Taula 2.7 mostra alguns valors de S per a diferents geometries i impulsors. N_{JS} disminueix significativament a mesura que augmenta la grandària de l'impulsor, no només a causa de l'efecte directe de D_i , sinó també perquè la relació D_i/D_t influeix sobre el valor de S . Tal com es mostra a la Taula 2.7 per a les turbines *Rushton*, el valor de S per a valors constants de la relació D_i/D_t disminueix a mesura que es redueix l'espai d'impulsió, de manera que es requereixen velocitats d'agitador més baixes per a una suspensió completa. És important assenyalar que encara que l'agitador s'opere a una velocitat igual o major a N_{JS} per a mantenir una suspensió total de partícules, no significa necessàriament que aquesta suspensió siga homogènia per tot el volum del fermentador.

Si s'injecta gas al bioreactor, la formació de cavitats de gas darrere dels àleps impulsors redueix la capacitat de bombeig líquid del rodets i, per tant, se solen requerir velocitats d'agitació més altes per a mantenir els sòlids en suspensió en sistemes amb aeració.

Per a diversos tipus de rodets s'han desenvolupat equacions empíriques per a estimar la velocitat d'agitació requerida per a mantenir una suspensió completa en presència de gasos (N_{JSg}). Per al cas de turbines *Rushton* (amb una relació $H_i/D_t = 1/4$):

$$N_{JSg} = N_{JS} + 2,4 Q_g/V \quad \text{per a } D_i/D_t = 0,33 \quad \text{Eq. 2.55}$$

$$N_{JSg} = N_{JS} + 0,94 Q_g/V \quad \text{per a } D_i/D_t = 0,50 \quad \text{Eq. 2.56}$$

on Q_g/V és el cabal de gas per unitat de volum de bioreactor o, el que és el mateix, el flux de gas en unitats de vvm (volum de gas per volum de líquid per minut, expressat en unitats de min^{-1}). En tot cas, cal recordar que tant N_{JS} com N_{JSg} es quantifiquen en rps (s^{-1}). Òbviament, les equacions anteriors no són adequades si al sistema hi ha *flooding*. Per altra banda, poden ser poc rigoroses en sistemes amb partícules de baixa densitat, és a dir quan $(\rho_p - \rho_L) < 50 \text{ kg/m}^3$.

TEMA 3

ESTERILITZACIÓ

3.1	Introducció	2
3.2	Esterilització del medi.....	4
3.2.1	Esterilització tèrmica	4
3.2.2	Filtració.....	19
3.3	Esterilització d'aire	22

3.1 INTRODUCCIÓ

L'esterilització consisteix en l'eliminació o destrucció de tots aquells microorganismes capaços de competir amb l'organisme desitjat en les condicions de cultiu. Aquest concepte porta aparellats alguns problemes que cal ressaltar. En primer lloc, no hi ha un mètode fiable quantitatiu per a mesurar la concentració de contaminants en el sistema, i en segon lloc, no resulta fàcil destruir tots els microorganismes quan es tracta de grans volums d'aire o de medi de cultiu. Per això, l'esterilització industrial es duu a terme sempre sota la hipòtesi de "risc acceptable" i, per tant, serà la missió de l'enginyer que dirigeix l'operació o dissenya el sistema seleccionar el "grau de risc" amb el qual dur a terme l'operació.

Com que un producte de fermentació s'obté a partir del cultiu d'un determinat organisme o línia cel·lular en un medi molt ric en nutrients, la presència d'organismes aliens al sistema donaran lloc a una pèrdua de productivitat com a conseqüència de la competitivitat pels nutrients. Fins i tot, en cas d'una fermentació en continu, seria possible un desplaçament complet de la població d'interès per part de la invasora a llarg termini. També podria donar-se el cas que el mateix microorganisme invasor (o algun metabòlit produït per aquest) donara lloc a la contaminació del producte d'interès o en dificultara fins a cert grau la recuperació. En altres casos, pot produir-se la degradació del producte desitjat per part del contaminant biològic.

Els procediments d'esterilització s'apliquen per a assegurar que un procés siga realitzat solament per l'organisme desitjat, evitar la contaminació ambiental, permetre l'ús segur dels productes i evitar-ne el deteriorament.

Un procés típic de fermentació es pot contaminar de moltes maneres, de forma que per a evitar-ho caldrà posar èmfasi en:

1. Disseny i construcció correctes de la planta de fermentació (especialment importants el segellat i l'aïllament dels equips).
2. Utilització d'un inòcul pur per a iniciar la fermentació.
3. Esterilització del medi de fermentació.
4. Esterilització del fermentador i dels equips auxiliars.
5. Esterilització de tots els materials que s'han d'afegir a la fermentació durant el procés, per exemple aire, nutrients, antiescumants, reguladors de pH, etc.
6. Manteniment de condicions asèptiques durant la fermentació.
7. Establiment de procediments operatius detallats per a l'esterilització, el manteniment asèptic i la formació del personal.

El grau en què s'adopten aquests procediments dependrà de la probabilitat de contaminació i de les conseqüències que puga generar aquesta contaminació. Cal recordar que hi ha bioprocessos "protegits" o "autoregulats" en els quals l'organisme d'interès no té competència significativa amb altres per la seua adaptabilitat al medi o per la generació de condicions selectives favorables. La cervesa representa un cas paradigmàtic d'aquestes fermentacions, no per casualitat és un bioprocés associat als inicis de la civilització. El llúpul, responsable del sabor amarg característic de la cervesa, té certs components que generen inhibició en el desenvolupament de molts microorganismes; a més, el creixement del llevat tendeix a disminuir el pH del medi i a afavorir el seu creixement competitiu. Això fa possible que el procés siga possible sense esterilització exhaustiva del medi i dels equips. A més, les precaucions utilitzades en el desenvolupament de l'inòcul per a la fabricació de cervesa són molt menys estrictes que, per exemple, en una fermentació amb antibiòtics.

No obstant això, la gran majoria dels bioprocessos moderns són susceptibles de ser contaminats. En aquest cas, el procés només seria possible en funció de la naturalesa del contaminant, el nivell de contaminació, la seua capacitat de supervivència en el procés de recuperació de producte (*down-stream processing*) i de la probabilitat que el contaminant siga un patògen o pugua produir toxines (Figura 3.1).

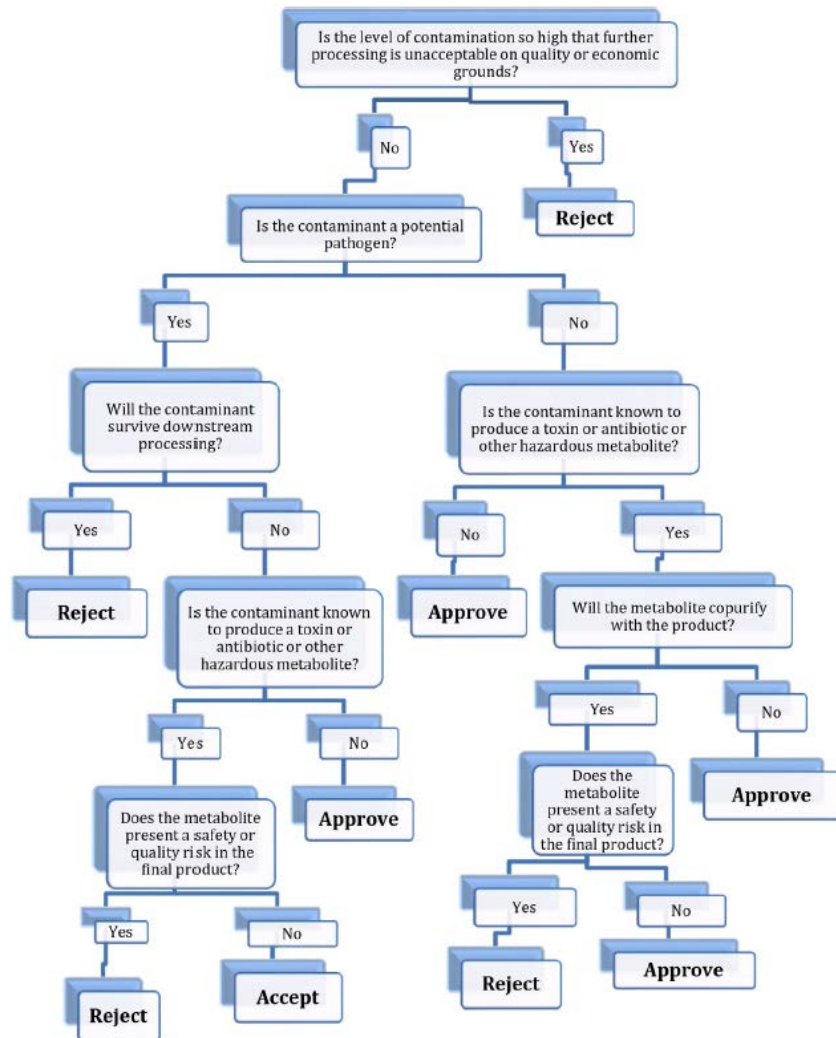


Figura 3.1. Diagrama de flux de decisions per a dur a terme una fermentació contaminada. (Stanbury, P.F., Whitaker, A. i Hall, S.J. *Principles of Fermentation Technology*, Elsevier).

A l'altre extrem de l'espectre de les fermentacions "protegides" o poc susceptibles de ser afectades per agents contaminants, es troben aquells processos (microbians o cultius cel·lulars) que produeixen vacunes o altres productes biològics injectables. Si es detecta contaminació en aquests processos es rebutja el lot immediatament i s'hauria de tancar l'equip per tal d'iniciar una investigació sobre la causa de contaminació detectada.

En un ampli treball de revisió bibliogràfica, Pollard (2011) va trobar una relació entre el tipus d'agent contaminant i el seu probable origen. Així, els bacils grampositius formadors d'espores estarien relacionats amb el tractament deficient del medi de fermentació o amb una neteja inadequada del bioreactor. La presència de bacteris gramnegatius és indicativa de fuites en l'aigua de refrigeració o de la presència d'humitat en l'aire. Per altra banda, la contaminació per bacteris esfèrics (cocs) grampositius normalment estaria vinculada amb deficiències en el tractament de l'aire.

3.2 ESTERILITZACIÓ DEL MEDI

L'esterilització del medi es duu a terme mitjançant l'eliminació dels organismes viables, com en la filtració, o mitjançant destrucció d'una de les següents formes:

- Calefacció en presència d'aigua (mitjançant vapor) o en sec (mitjançant resistències elèctriques).
- Irradiació mitjançant radiació ultraviolada, gamma o rajos X.
- Tractament ultrasònic.
- Tractament amb productes químics en solució o en forma gasosa.

De tots aquests mètodes, la filtració i l'esterilització tèrmica són els de més aplicació a nivell industrial. La filtració és eficaç per a l'eliminació de bacteris i fongs, encara que les caigudes de pressió són molt altes i per tant tenen associades costos d'impulsió elevats. No obstant això, presenta com a avantatge que no danya el medi de cultiu i, per tant, resulta particularment interessant quan hi ha presència de materials inestables tèrmicament. Normalment s'empra en casos com ara l'esterilització de medis de cultiu per a cèl·lules animals, que es caracteritzen per ser completament solubles i per contenir components tèrmicament làbils. En general, sol ser més fàcil procedir a la destrucció que a la separació dels microorganismes contaminants. Si no hi ha problemes de termoestabilitat, s'utilitza l'esterilització per calor, normalment calor humida.

Actualment, en moltes aplicacions industrials es duu a terme l'esterilització en sistemes en discontinu, encara que hi ha un interès creixent pels mètodes en continu. Aquests mètodes presenten múltiples avantatges, entre els quals destaquen l'estalvi energètic, menys necessitat d'espai en planta i, a causa de la possibilitat de treballar a elevades pressions (i en conseqüència altes temperatures), menys temps d'exposició, que redunda en un deteriorament menor de la qualitat del medi de cultiu.

3.2.1 Esterilització tèrmica

3.2.1.1 Cinètica de destrucció tèrmica de microorganismes

Per a destruir microorganismes caldrà una dosi letal, que per als processos tèrmics serà funció del binomi temperatura/temps. Factors com ara la presència d'aigua, oxigen, gasos, pH, estat vegetatiu de les cèl·lules, etc. presentaran influència en aquest binomi. Per això, qualsevol dada sobre mortalitat ha d'incloure les condicions experimentals, i en particular, el nivell inicial de contaminació.

En condicions letals, els organismes no moren sincrònicament. En el cas més general, la població desapareix segons una cinètica de primer ordre ("xoc únic"), proporcional a la presència de microorganismes en un moment donat:

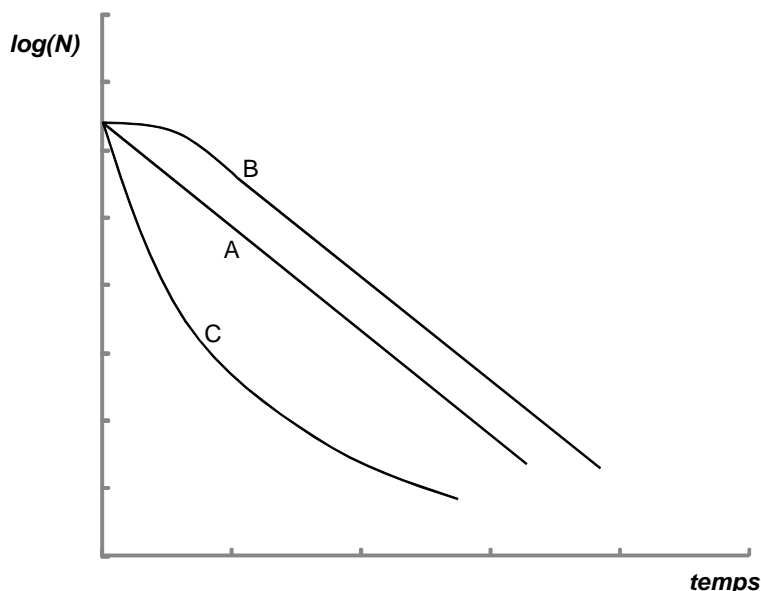
$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N \quad \text{Eq. 3.1}$$

on N representa el nombre de microorganismes viables (nombre de cèl·lules), t és el temps (min) i k la constant de velocitat (min^{-1}), que serà funció de la temperatura. Cal emfasitzar que N no és la concentració sinó el nombre d'organismes presents en un moment donat en el volum de caldo a esterilitzar.

Si s'integra l'Eq. 3.1 des d'un nombre inicial de cèl·lules N_0 , a $t = 0$, resulta:

$$N = N_0 \exp(-kt) \quad \text{Eq. 3.2}$$

i, en conseqüència, s'aprecia com el nombre de cèl·lules viables, N , disminueix segons una variació exponencial negativa. Per tant, una representació del logaritme del nombre d'organismes supervivents enfront del temps de tractament a una temperatura determinada, produirà una línia recta (corba A de la Figura 3.2) amb un pendent negatiu igual a la constant cinètica de destrucció tèrmica ($-k$).



A: cèl·lules vegetatives. B: espores. C: organismes danyats o sensibles a la calor.

Figura 3.2. Corbes de supervivència: variació del logaritme del nombre de cèl·lules viables amb el temps.

No totes les poblacions mostren una cinètica de “xoc únic”: la corba B de la Figura 3.2 a mostra una major resistència inicial abans de la disminució logarítmica de la població. Aquest comportament és típic d'algunes espores que necessiten una dosi letal inicial perquè el procés de destrucció comence a ser efectiu. En aquest cas, les equacions Eq. 3.1 i Eq. 3.2 solament són vàlides per al tram lineal del procés. En la pràctica, també es poden trobar corbes de supervivència no lineals (corba C a la Figura 3.2). Aquest és el comportament típic d'organismes danyats o particularment sensibles a la calor.

En qualsevol cas, a partir de la tendència exponencial que descriu quantitativament la desaparició del contaminant biològic a temperatures elevades, s'arriba a dues conseqüències importants:

1. El temps necessari per aconseguir una esterilització completa (és a dir, per a un valor final de $N = 0$) és infinit. Per tant, com que el procés s'ha de realitzar en un temps finit, s'haurà d'assumir un “risc acceptable” que caldrà definir a priori.
2. Per a temps suficientment elevats, la funció matemàtica pot prendre valors de N menors que la unitat ($N < 1$), la qual cosa semblaria absurda donat que no té sentit parlar de fraccions de cèl·lules viables.

En aquest context, un valor de N menor que la unitat s'interpreta en un sentit probabilístic de supervivència. Així, si per exemple $N = 0,01$, significa que hi ha una probabilitat entre 100 (1 %) que un organisme siga viable després del tractament d'esterilització. O dit d'altra manera, de cada 100 cicles d'esterilització, en un hi haurà supervivència del contaminant. És a dir, es tracta de la probabilitat de fallada en l'esterilització. En termes probabilístics, cal remarcar que en ocasions es parla de probabilitat d'èxit en l'esterilització (P) en compte de probabilitat de fallada o grau d'esterilització (N). Òbviament la relació entre totes dues variables ve donada per $P = 1 - N$, tal i com es mostrarà més endavant. Normalment el factor

de risc acceptat a escala industrial és de una fallada per mil cicles, és a dir, un grau d'esterilització de $N = 0,001$.

En molts casos, la informació cinètica del procés de destrucció tèrmica es proporciona en forma de “temps de reducció al dècim” o valor D , que quantifica el temps necessari per a reduir la presència de cèl·lules viables a un 10% del seu valor inicial. Així doncs, és possible relacionar la constant de velocitat k amb el temps de reducció al dècim, D , tal com es mostra en Eq. 3.3:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{1}{10} = \exp(-kD) \quad \mapsto \quad D = \frac{2.303}{k} \quad \text{Eq. 3.3}$$

La temperatura és un factor clau en la mort tèrmica dels microorganismes. En la Figura 3.3 s'observa que la mort tèrmica en el cas d'espores i de cèl·lules vegetatives pot ser diferent (encara que no es coneix molt bé el mecanisme d'aquesta diferència de comportament), i és molt major el valor de k per a les cèl·lules vegetatives.

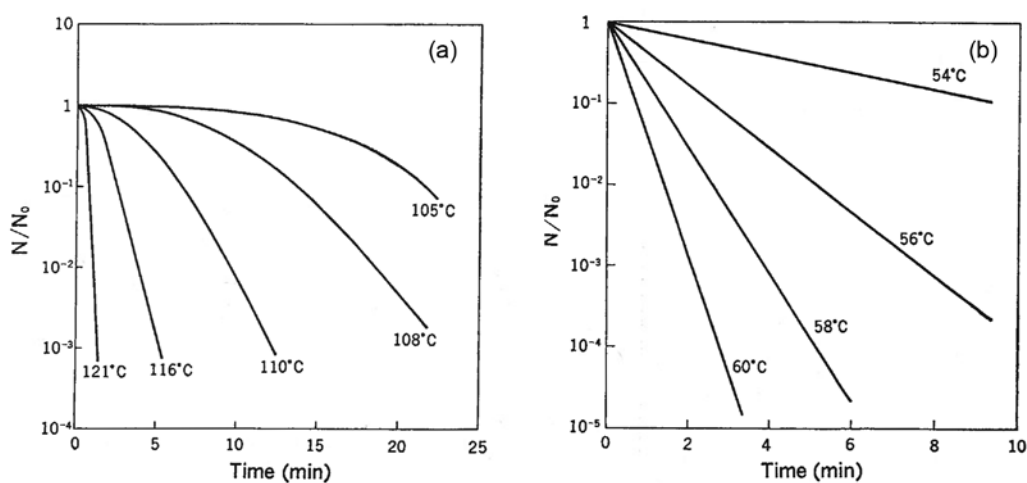


Figura 3.3. Corbes de mort tèrmica per (a) espores del *Bacillus stearothermophilus* FS 7954, (b) *E. coli*. (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc.).

Resulta evident que, atès que la resistència tèrmica de les espores sol ser molt superior a la de les cèl·lules vegetatives, els càlculs de temps d'esterilització hauran de referir-se a les espores. Valors típics de D per a aquestes últimes es troben entre 0,5 - 3 min a 121°C (Taula 3.1), mentre que els valors de k a 121°C per a les cèl·lules vegetatives varien entre $10 - 10^{10} \text{ min}^{-1}$ depenent del tipus de microorganisme.

Taula 3.1. Valors típics de k i D per espores de diferents espècies de microorganismes a 121 °C

Microorganisme	k a 121°C (min^{-1})	D a 121°C (min)
<i>Bacillus subtilis</i> FS 5230	3,8-2,6	0,6-0,9
<i>Bacillus stearothermophilus</i> FS 1518	0,77	3,0
<i>Bacillus stearothermophilus</i> FS 617	2,9	0,8
<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	1,8	1,3

(Aiba, S. i col. “*Biochemical Engineering*”).

Per altra banda, hi ha la possibilitat que el medi tinga més d'un agent contaminant. La Figura 3.4 il·lustra el comportament característic de l'esterilització de cultius mixtos que contenen dues espècies amb diferents sensibilitats tèrmiques. A la Figura 3.4a, es mostra la situació

més complexa, on el contaminant més làbil tèrmicament és majoritari, això fa que el valor de la constant k vaja canviant (disminuint) amb l'evolució de l'esterilització. La Figura 3.4b representa la situació inversa, on predomina el tipus més resistent i la seua presència oculta la destrucció del contaminant biològic menys resistent.

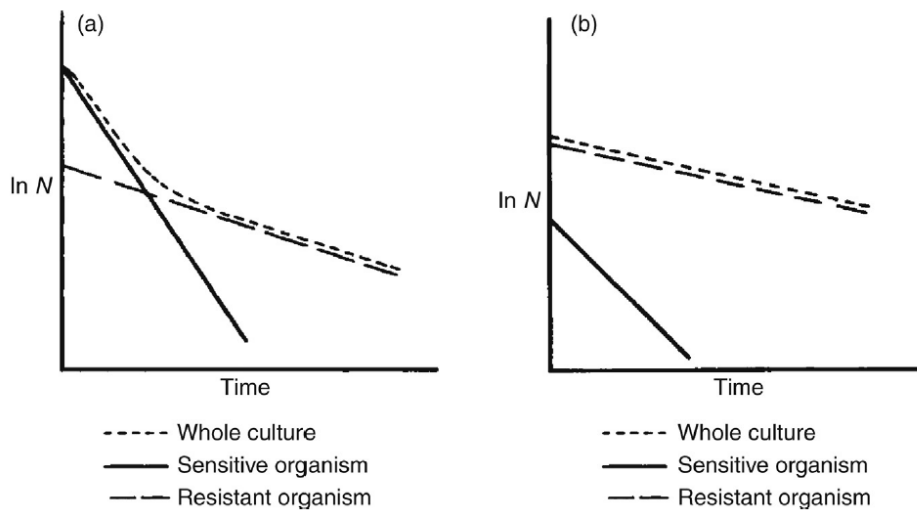


Figura 3.4. Corbes de destrucció tèrmica de cultius microbians mixtos.
(Stanbury, P.F., Whitaker, A. i Hall, S.J., *Principles of Fermentation Technology*, Elsevier).

Com qualsevol cinètica de primer ordre, la variació de la constant de destrucció tèrmica amb la temperatura s'expressa mitjançant una correlació d'Arrhenius:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad \text{Eq. 3.4}$$

on l'energia d'activació (E) pren valors de 200-400 kJ/mol per a cèl·lules vegetatives i espores. La destrucció de nutrients essencials del medi, com ara vitamines o aminoàcids, també es pot aproximar a una cinètica de primer ordre, encara que les energies d'activació solen ser més baixes (10-100 kJ/mol).

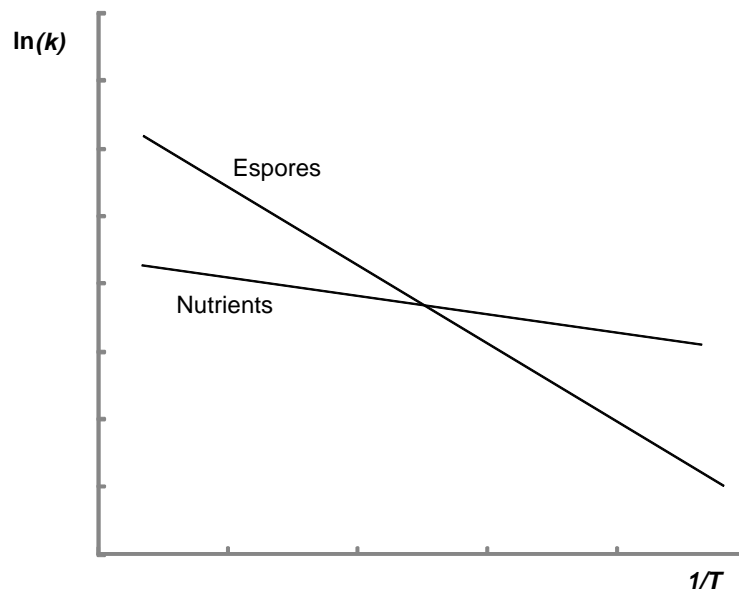


Figura 3.5. Efecte de l'energia d'activació sobre la destrucció d'espores i nutrients.

Si es representa el logaritme de la constant de destrucció tèrmica (k) enfront de la inversa de la temperatura ($1/T$), s'observa una dependència lineal, on el pendent depèn de l'energia d'activació. Així, tal com es desprèn de la Figura 3.5, serà aconsellable dur a terme l'esterilització a temperatures altes (i per tant a temps curts) on s'aconsegueix accelerar més la destrucció dels agents contaminants que la desnaturalització del medi (destrucció de nutrients).

Per tal de poder dimensionar o analitzar quantitativament un procés d'esterilització tèrmica, caldria conèixer les característiques de cadascun dels agents contaminants, la qual cosa no resulta pràcticament possible. En la pràctica industrial se sol emprar un valor de la constant de destrucció obtingut empíricament o agafar un contaminant de referència, com ara espores de *Geobacillus stearothermophilus*, que és un dels microorganismes més resistents al tractament tèrmic. Així, agafant aquest organisme com a referència per al disseny d'esterilització, s'aplica implícitament un factor de seguretat considerable. Deindoerfer i Humphrey van determinar les característiques cinètiques de la destrucció tèrmica de les espores de *Geobacillus stearothermophilus*:

$$\text{Energia d'activació: } E = 283,3 \text{ kJ mol}^{-1}$$

$$\text{Constant d'Arrhenius: } k_0 = 10^{36,2} \text{ s}^{-1}$$

És important recordar que no s'ha d'adoptar sempre aquest microorganisme com a referència per al disseny. Si se sap quin és el contaminant més resistent en el caldo de fermentació de treball, cal adoptar-lo com a referència. A més, és important recordar que la informació cinètica té una dependència amb les característiques específiques del medi que pot arribar a ser de gran importància.

3.2.1.2 Supervivència

La dosi d'esterilització necessària dependrà del nivell de contaminació inicial i del grau d'esterilització requerit.

La probabilitat (p) de destrucció de un organisme en un temps menor que t a una temperatura determinada és:

$$p = 1 - \exp(-k \cdot t) \quad \text{Eq. 3.5}$$

La probabilitat (P) que els N_0 microorganismes presents en el medi queden destruïts a una temperatura determinada en un temps t es pot quantificar mitjançant:

$$P = [1 - \exp(-k \cdot t)]^{N_0} \quad \text{Eq. 3.6}$$

Així, la probabilitat que, almenys, un microorganisme sobrevisca durant aquest temps (és a dir, la probabilitat de fallada en el procés d'esterilització), serà:

$$1 - P = 1 - [1 - \exp(-k \cdot t)]^{N_0} \quad \text{Eq. 3.7}$$

on, per a valors grans de $k \cdot t$, es compleix:

$$1 - P = 1 - [1 - \exp(-k \cdot t)]^{N_0} = N_0 \exp(-k \cdot t) \quad \text{Eq. 3.8}$$

De l'equació Eq. 3.8 es dedueix que la probabilitat de fallada ($1 - P$) coincideix amb el nombre de microorganismes viables una vegada efectuada l'operació d'esterilització (N), per a valors de $k \cdot t$ suficientment alts. Així, normalment, el nivell de contaminació desitjat s'expressa com a "fracció de cèl·lula", el significat físic de la qual coincideix amb la probabilitat de contaminació. Per exemple, aconseguir un valor de $N = 1 - P = 10^{-3}$ significa que s'accepta el risc de fallada en una esterilització de cada 1000. De l'equació Eq. 3.8 també

se'n desprèn que no és possible teòricament aconseguir l'esterilització absoluta, ja que es necessitaria un temps infinitament llarg.

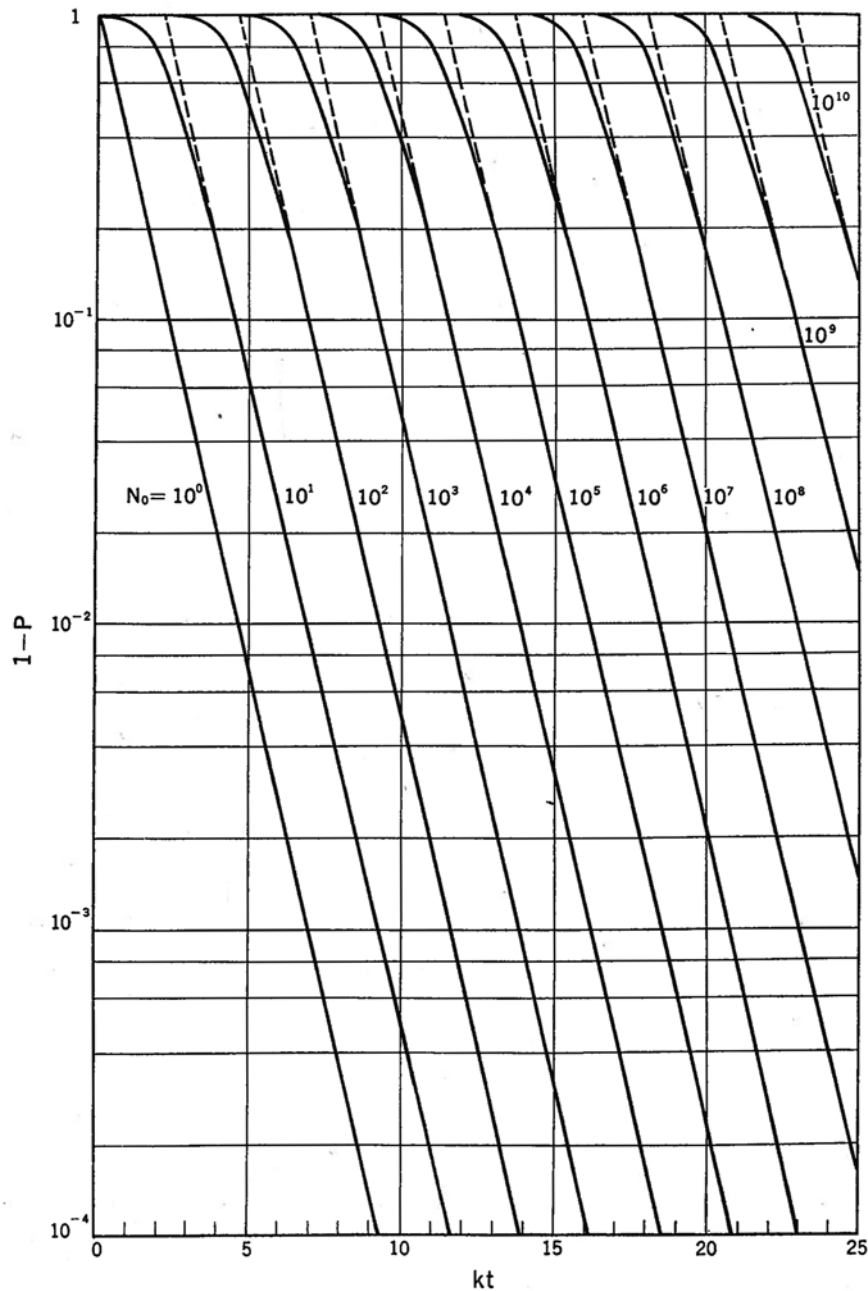


Figura 3.6. Gràfica d'esterilització.

(Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc.).

En la Figura 3.6 es mostra la gràfica d'esterilització, que relaciona la probabilitat de fallada i el producte $k \cdot t$ per a diferents valors de contaminació inicial, N_0 . La gràfica es pot utilitzar de forma molt senzilla: si se suposa que un medi presenta una contaminació inicial de, per exemple, 10^7 cèl·lules (ço és, $N_0 = 10^7$ cèl·lules) i es vol aconseguir un grau d'esterilització de 10^{-3} ($N = 10^{-3}$), llavors cal llegir en la gràfica d'esterilització el valor en l'eix d'abscisses a partir del punt d'intersecció entre el valor d'ordenades $1 - P = 10^{-3}$ i la corba corresponent a $N_0 = 10^7$. En aquest cas particular de la lectura en l'eix d'abscisses s'obté el valor del producte $k \cdot t = 23$. Per tant, si és coneguda la constant de velocitat a la temperatura

d'esterilització, k , o el temps de reducció al dècim, D , es pot determinar el temps necessari per a l'esterilització del medi.

3.2.1.3 Esterilització en discontinu

Malgrat el gran nombre d'avantatges de les operacions en continu, els processos d'esterilització tèrmica en discontinu encara s'utilitzen molt en la indústria biotecnològica. Normalment s'esterilitzen conjuntament el medi i el bioreactor. S'empren dos procediments: autoclaus o directament en el bioreactor.

Autoclaus:

Es tracta de tancs relativament petits per a l'esterilització amb vapor, de volums de fins a unes desenes de litres. Les autoclaus són controlades mitjançant manòmetres i termòmetres. Tot l'aire ha de ser eliminat abans del cicle d'escalfament, ja que mesclades d'aire i vapor a una pressió determinada aconseguiran una temperatura més baixa que el vapor pur a la mateixa pressió. Per a càrregues d'autoclaus amb recipients de petites quantitats (de 100 ml a botelles de 5 litres), es pot admetre que els gradients de temperatura són negligibles en cada moment atès que la penetració de la calor és ràpida i, en conseqüència, es poden emprar els temps d'esterilització mostrats en la Taula 3.2. A aquests temps caldrà sumar els que es necessiten per a aconseguir aquesta temperatura i el temps de refredament, temps variables en funció del volum i material del recipient. A nivell orientatiu, el temps total oscil·la entre 30 i 70 minuts en funció del tipus de càrrega de l'autoclaus. El temps de refredament ha de ser l'adequat perquè la pressió descendeixi lentament. En cas contrari, es poden produir trencaments o un bombolleig violent.

Taula 3.2. Temps d'esterilització recomanats per a ús d'autoclaus.

T (°C)	116	118	121	125	132
t (min)	30	18	12	8	2

Quan s'esterilitzen volums elevats, es produeix una falta d'homogeneïtzació que pot comportar gradients de temperatura en el medi a fermentar, particularment si es tracta de medis viscosos o amb partícules en suspensió. Per a evitar aquest problema, s'han dissenyat autoclaus en les quals s'agita el medi mentre s'esterilitza. De fet, si no s'empra algun sistema d'agitació, en els mitjans amb partícules en suspensió (com poden ser midó o gels de proteïnes) l'esterilització és pràcticament impossible de dur a terme considerant la resistència a la transmissió de calor. Quan es carreguen els equips, cal revisar prèviament l'estat de les vàlvules i els tancaments per a permetre l'accés del vapor al muntatge.

Esterilització en el bioreactor:

L'esterilització tèrmica en el mateix bioreactor sol ser l'opció més habitual a escala industrial quan l'operació es realitza en discontinu. El medi s'escalfa fins a la temperatura d'esterilització mitjançant diferents sistemes de calefacció (Figura 3.7):

- Injecció directa de vapor al medi.
- Escalfament mitjançant resistències elèctriques (menys favorable econòmicament).
- Introducció de vapor/refrigerant en bescanviadors de calor: serpentí o camisa.

En el cas particular de la injecció directa de vapor, cal tenir en compte la dilució associada a la condensació del vapor (que podria arribar a ser entre el 10-20% del volum del líquid). A més, cal una qualitat de vapor suficient per a evitar la contaminació del medi amb ions metàl·lics o compostos orgànics.

En funció de la velocitat de transmissió de calor, el procés d'escalfament (i posterior refrigeració) pot necessitar bastant temps en bioreactors de gran volum. Una volta assolida la temperatura d'esterilització desitjada, aquesta es manté constant durant un determinat període de temps (temps de manteniment). Finalment, es fa circular aigua de refrigeració a través de la camisa (o del serpentí) del bioreactor per tal de refredar el medi fins al valor desitjat. Generalment, els períodes de manteniment a temperatura constant són de l'ordre de minuts, mentre que l'escalfament i el refredament de grans volums de líquid necessiten hores.

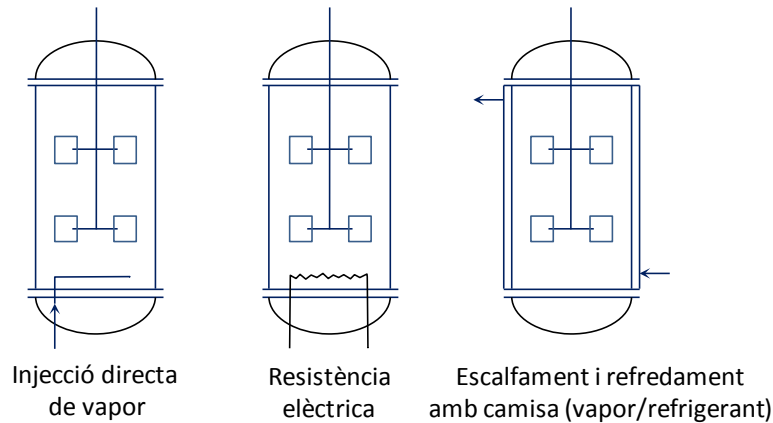


Figura 3.7. Opcions per a l'esterilització tèrmica del medi en discontinu.

Com que en una esterilització tèrmica la disminució de cèl·lules viables és exponencial (Eq. 3.2), se sol treballar amb relacions logarítmiques, de forma que el terme $\ln(N_0/N)$ s'empra com a criteri de disseny. Aquest terme es representa mitjançant el símbol ∇ , que s'anomena factor *Nabla* o factor *Del*. Es tracta d'una mesura de la reducció exponencial dels microorganismes viables sotmesos a una determinada temperatura durant un determinat temps.

Per a dissenyar una operació d'esterilització en discontinu cal determinar el temps de manteniment necessari per a aconseguir el nivell de destrucció prefixat. En aquest sentit, cal tenir en compte que la mort cel·lular es produeix durant tot el procés d'esterilització, incloent-hi els períodes d'escalfament i refredament. Així doncs, en la determinació del temps de manteniment serà necessari considerar la destrucció cel·lular que es produeix durant els períodes d'escalfament i refredament i, per tant, tenir en compte la variació de la constant de velocitat amb els perfils de temperatura. Per la qual cosa s'ha de substituir l'equació d'Arrhenius (Eq. 3.4), que descriu la variació de la constant amb la temperatura, en l'equació de velocitat de destrucció tèrmica (Eq. 3.1):

$$\frac{dN}{dt} = -k_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) N \quad \text{Eq. 3.9}$$

L'equació anterior s'integra entre el nombre d'organismes a l'inici del procés (N_0 a $t = 0$) i el grau d'esterilització requerit (N) per a un temps t :

$$\nabla_{total} = \ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = k_0 \int_0^t \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dt \quad \text{Eq. 3.10}$$

on cal tenir en consideració que T dependrà del temps en els períodes de escalfament i refredament. En l'expressió anterior, ∇_{total} representa el criteri de disseny del procés d'esterilització complet. Tal i com s'ha indicat anteriorment, sovint s'opera amb un criteri de disseny $\nabla_{total} = \ln(N_0/10^{-3})$, ço és, amb una probabilitat de fallada d'1 entre 1000 (1‰).

Deindoerfer i Humphrey van associar cada tipus d'escalfament i refredament a un perfil temperatura-temps ($T-t$). En la Taula 3.3 es presenten les equacions que permeten el càlcul dels perfils $T-t$ en funció del tipus d'esterilització seleccionat. Mitjançant aquests perfils i l'Eq. 3.10, es pot determinar el temps d'exposició del medi en el sistema d'esterilització. Per la qual cosa cal tenir en compte la contribució al procés d'esterilització de cadascuna de les etapes: escalfament, manteniment i refredament. D'aquesta forma, ∇_{total} es pot expressar com una suma d'aquestes contribucions a l'esterilització:

$$\nabla_{total} = \nabla_{escalfament} + \nabla_T + \nabla_{refredament} \quad \text{Eq. 3.11}$$

Taula 3.3. Perfils de temperatura-temps per la esterilització en discontinu.

Dispositiu	Perfil $T-t$	α, β, γ
Injecció directa de vapor	$T = T_0 \left(1 + \frac{\alpha t}{1 + \gamma t} \right)$ Hiperbòlic	$\alpha = \frac{h \cdot s}{Mc_p T_0}$ $\gamma = \frac{s}{M}$
Resistència elèctrica	$T = T_0(1 + \alpha t)$ Lineal	$\alpha = \frac{q}{Mc_p T_0}$
Camisa de vapor	$T = T_H(1 + \beta e^{-\alpha t})$ Exponencial	$\alpha = \frac{U \cdot A}{Mc_p}$ $\beta = \frac{T_0 - T_H}{T_H}$
Refrigerant en camisa	$T = T_{CO}(1 + \beta e^{-\alpha t})$ Exponencial	$\alpha = \frac{wc_{p,r}}{Mc_p} \left[1 - \exp\left(-\frac{UA}{wc_{p,r}}\right) \right]$ $\beta = \frac{T_0 - T_{CO}}{T_{CO}}$

T : temperatura (K).

T_0 : temperatura inicial del medi (K).

T_H, T_{CO} : temperatura de la font de calor i del refrigerant (K).

h : entalpia del vapor referida al medi (kJ/kg).

s : cabal de vapor (kg/s).

M : massa del medi a esterilitzar (kg).

c_p : calor específica del medi (kJ/kg·K).

q : potència calorífica aportada per la resistència (kW)

$c_{p,r}$: calor específica del refrigerant (kJ/kg·K).

w : cabal del refrigerant (kg/s).

Si es considera que l'escalfament es produeix des d'un temps 0 a t_1 i redueix el nombre de cèl·lules de N_0 a N_1 :

$$\nabla_{escalfament} = \ln\left(\frac{N_0}{N_1}\right) = k_0 \int_0^{t_1} \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dt \quad \text{Eq. 3.12}$$

En el període de manteniment a temperatura constant (de t_1 a t_2) es considera una reducció de cèl·lules contaminants de N_1 a N_2 :

$$\nabla_T = \ln\left(\frac{N_1}{N_2}\right) = k_0 \int_{t_1}^{t_2} \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dt \quad \text{Eq. 3.13}$$

com que en aquest període de manteniment no hi ha variació de la temperatura:

$$\nabla_T = \ln\left(\frac{N_1}{N_2}\right) = k_0 \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) (t_2 - t_1) \quad \text{Eq. 3.14}$$

Finalment, el refredament es produeix en un període de temps entre t_2 i t_3 , de forma que N_2 es redueix fins un valor final del procés, N :

$$\nabla_{\text{refredament}} = \ln\left(\frac{N_2}{N}\right) = k_0 \int_{t_2}^{t_3} \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dt \quad \text{Eq. 3.15}$$

Amb les equacions anteriors es pot determinar el temps de manteniment ($t_2 - t_1$) per aconseguir un determinat grau d'esterilització, N , si es coneix la contaminació inicial, N_0 , i s'han seleccionat els equips d'escalfament i refredament i s'ha fixat la temperatura de manteniment. La importància del dimensionament correcte de l'esterilització està relacionada amb l'economia del procés i, sobretot, amb la minimització de la destrucció dels nutrients presents en el procés, de manera que sempre interessa que els temps d'esterilització es mantinguin tan curts com siga possible.

3.2.1.4 Esterilització en continu

L'esterilització en continu consta de tres etapes:

1. El medi de cultiu es bombeja a través de la font de calor, on, ràpidament, s'aconsegueix la temperatura d'esterilització a mesura que circula el medi.
2. A continuació, el medi passa a través d'una conducció aïllada tèrmicament (etapa denominada *holding*), on la temperatura d'esterilització es manté durant un període de temps igual al temps de residència del fluid en la conducció.
3. Finalment, es transfereix a una zona de refredament, on la temperatura es redueix al més ràpidament possible.

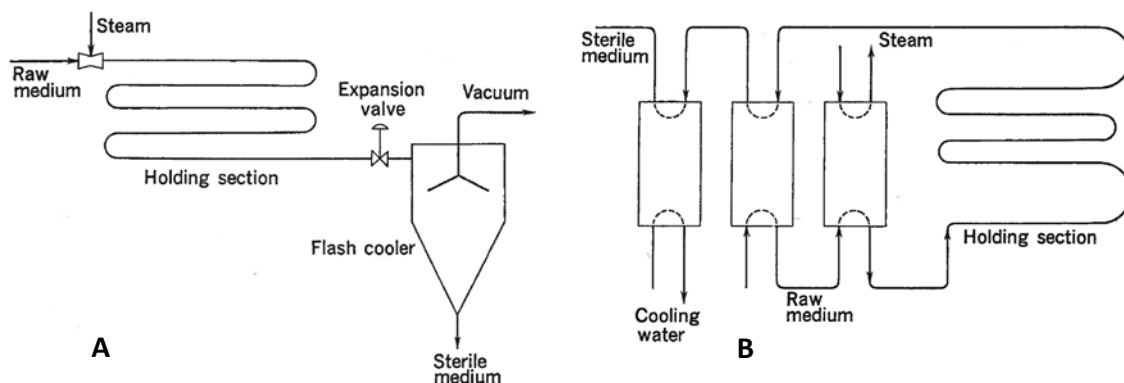


Figura 3.8. Dispositius utilitzats per a l'esterilització tèrmica en continu.

A: Injecció directa de vapor. B: Intercanvi de calor indirecta.
(Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc.).

L'esterilització en continu permet treballar a pressions més elevades, per la qual cosa els temps d'exposició del medi a la font de calor es redueixen notablement, i d'aquesta manera disminueix el grau de desnaturalització dels components del medi. A més, els temps de residència del medi en els bescanviadors (escalfament i refredament) són molt curts, cosa

que facilita el control del procés, així que les condicions són molt més fàcilment reproduïbles que en un sistema en discontinu i les necessitats de mà d'obra, molt més baixes. Per altra banda, pel fet de ser un sistema en continu, és possible l'estalvi energètic a partir del reciclatge de l'energia tèrmica. Tot això permet augmentar la productivitat global del procés de fermentació. Per contra, els únics avantatges dels processos en discontinu estan associats als costos d'adquisició d'equipament (no són necessaris en cas d'utilitzar el bioreactor com a instal·lació per l'esterilització), a la facilitat en el control manual (en cas de necessitar versatilitat) i quan el caldo de fermentació presenta una alta proporció de material en suspensió. Els possibles dispositius utilitzats s'esquematitzen en la Figura 3.8. El diagrama de flux d'una esterilització contínua típica amb bescanviadors de calors de geometria espiral es presenta en Figura 3.9. En la Figura 3.10 es mostren els perfils $T-t$ obtinguts per cadascun dels dispositius.

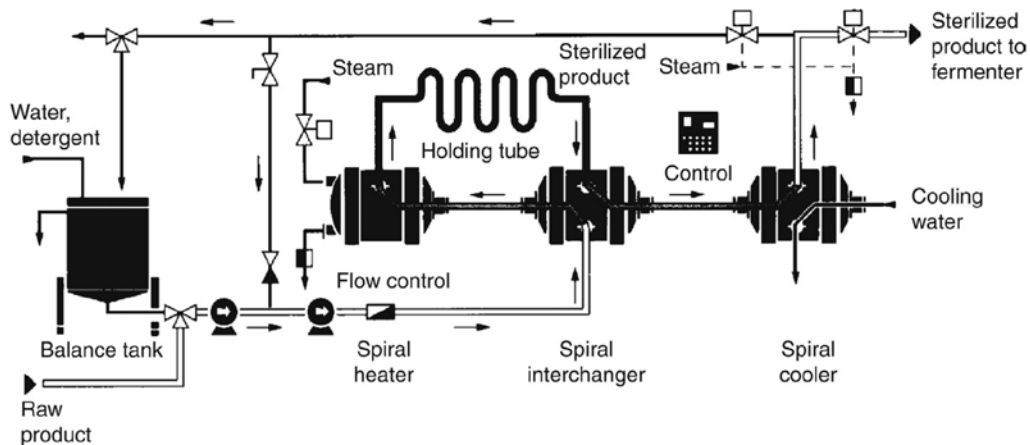


Figura 3.9. Sistema d'esterilització en continu, diagrama de flux típic.

(Stanbury, P.F., Whitaker, A. i Hall, S.J., *Principles of Fermentation Technology*, Elsevier)

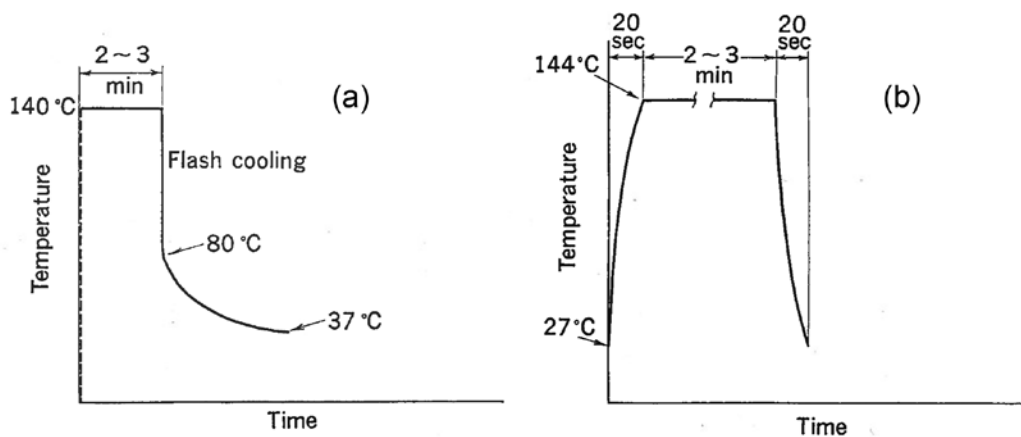


Figura 3.10. Perfils $T-t$ de la esterilització en continu.

(a) Injecció directa de vapor, (b) Escalfament indirecte amb vapor.

(Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc.).

Injecció directa de vapor:

Ofereix una alta eficàcia de transmissió de calor (igual que en els processos en discontinu) i baix cost de capital. El vapor s'injecta directament en el medi, que flueix a través d'un mesclador de tipus *Venturi*, i aconsegueix la temperatura desitjada de forma gairebé instantània. El flux es manté a la temperatura d'esterilització en un serpenti perfectament aïllat tèrmicament. El temps de residència es controla mitjançant el cabal i la longitud dels

tubs d'aquesta secció. Després es passa directament a un refredament ràpid per evaporació instantània: el fluid passa a través d'una vàlvula d'entrada a una cambra de buit en la qual la brusca caiguda de pressió provoca la vaporització de una petita fracció del medi (equivalent al vapor condensat en la injecció prèvia) que duu aparellada un descens sobtat de temperatura (Figura 3.8, A). El refredament fins a la temperatura de reacció es completa mitjançant un bescanviador de calor per aigua.

Escalfament indirecte per vapor:

Per a l'escalfament ràpid s'utilitza un bescanviador a través del qual pot circular vapor a pressions tan elevades com 500-700 kPa (aprox. 160-170 °C). Prèviament a aquest, es pot instal·lar un altre bescanviador que escalfa el medi a esterilitzar tot utilitzant caldo ja esterilitzat com a fluid calefactor. El manteniment es realitza com en el cas anterior, mitjançant una conducció tèrmicament aïllada. El refredament es completa amb un altre bescanviador (Figura 3.8, B). Encara que el temps d'escalfament i refredament és superior al del cas anterior (Figura 3.10), la contribució d'aquests períodes a l'esterilització del medi és notablement inferior que en un procés discontinu. Així, en el disseny dels sistemes d'esterilització en continu pot considerar-se negligible qualsevol contribució a la mort cel·lular que es produïska fora del període isoterm.

Com a exemple dels avantatges derivats del treball a més pressió, i per tant a més temperatura, en la Taula 3.4 es presenten els valors de T - t que permeten aconseguir graus similars d'esterilització, comparada amb la destrucció de vitamina present al medi.

Encara que aquests sistemes són altament recomanables a escala industrial pel gran nombre d'avantatges (control fàcil del procés; reducció de la quantitat de vapor necessària, 20-25% inferior; reducció del temps del cicle d'esterilització, etc.), presenten diversos problemes quan s'intenten aplicar a escala de laboratori, en particular quan el medi a esterilitzar conté partícules en suspensió.

Taula 3.4. Destrucció de vitamina en una esterilització tèrmica.
Influència del binomi temperatura-temps.

T (°C)	t (min)	Destrucció vitamina (%)
121	24,800	100,0
129	4,100	100,0
138	0,720	97,7
146	0,140	72,0
154	0,029	30,0
163	0,006	11,0

Disseny del procés:

El problema fonamental en l'esterilització en continu consisteix a determinar el temps de permanència del medi en la secció isoterma a alta temperatura per tal d'aconseguir el nivell d'esterilització desitjat. Pel que fa als temps d'escalfament i refredament, són tan curts que es pot admetre que durant aquestes fases la contribució a l'esterilització és negligible.

Cal tenir en compte que en l'esterilització en continu, el fluid circula a través d'una secció circular i dona lloc a un determinat perfil de velocitats. Aquest perfil serà funció del tipus de règim de circulació: laminar o turbulent, i en qualsevol cas presentarà certa desviació del flux ideal de pistó. Tal com s'observa en la Figura 3.11, en la hipòtesi de flux de pistó se suposa que tot el fluid avança amb un front pla, mentre que en les situacions reals, ja siga un

flux laminar o turbulent, el fluid en la zona central de la conducció avança més ràpidament que en la perifèria (amb una desviació de la idealitat molt més accentuada en el cas de la circulació laminar). D'aquesta manera, sota la hipòtesi de flux de pistó pot suposar-se que la velocitat mitjana de circulació ($v_{mitjana}$) coincideix amb la velocitat màxima en el centre de la conducció (v_{max}), mentre que en els fluxos reals, laminar o turbulent, la velocitat màxima en el centre de la conducció serà sempre més gran que la velocitat mitjana del fluid. Aquesta desviació del flux ideal es coneix com a distribució del temps de residència. Com a conseqüència de la distribució radial de la velocitat, l'ús d'un temps de residència mitjà pot originar grans errors en el disseny. Si s'utilitza el concepte de temps de residència mitjà se suposa que la reducció de contaminació entre l'entrada i l'eixida es manté constant, encara que en realitat, la reducció real de contaminants serà molt menor (atès que unes fraccions de fluid queden en la conducció més temps que unes altres), tal com es pot veure en l'exemple de la Taula 3.5.

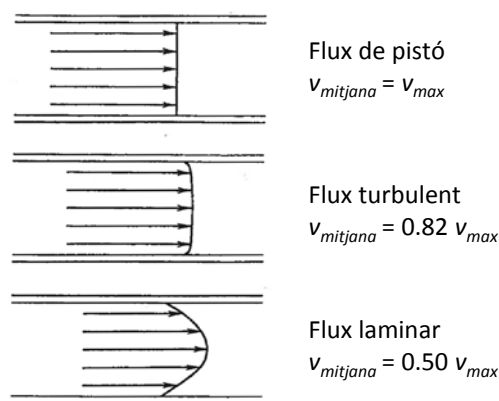


Figura 3.11. Perfils de velocitats en conduccions de secció circular.

Taula 3.5. Influència del sobre l'eficàcia de l'esterilització tèrmica en continu.

k (min^{-1})	Temps mitjà de residència (s)	Reducció nivell de contaminació, N/N_0		<i>Peclet</i>
		Flux de pistó	Real	
10	5	$1,8 \cdot 10^{-22}$	10^{-18}	200
10	5	$1,8 \cdot 10^{-22}$	$1,5 \cdot 10^{-16}$	100
10	5	$1,8 \cdot 10^{-22}$	$3 \cdot 10^{-15}$	70
10	5	$1,8 \cdot 10^{-22}$	$2 \cdot 10^{-13}$	50

Atkinson, B. i Mavituna, F.k, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*.

Per tal de quantificar la desviació respecte del flux de pistó s'utilitza un mòdul adimensional anomenat nombre de *Peclet* (Pe):

$$Pe = \frac{v \cdot L}{D_z} \quad \text{Eq. 3.16}$$

on v és la velocitat mitjana (m/s), L , la llargària de les conduccions que constitueixen la secció isoterma del sistema d'esterilització (m), i D_z , la dispersió axial (m^2/s). Pe agafa un valor molt gran quan el flux s'acosta al model ideal de pistó, en el qual la dispersió axial és negligible. En l'extrem oposat, $Pe = 0$ per a flux de mescla completa ($D_z \rightarrow \infty$). En l'exemple mostrat (Taula 3.1) s'observa que amb la hipòtesi de flux de pistó, la relació entre la contaminació a l'eixida i l'entrada és constant i independentment de Pe . No obstant això, a

causa de la distribució de temps de residència, la reducció real de contaminants biològics en l'esterilització és molt menor que la prevista teòricament segons aquesta hipòtesi de flux de pistó. Per tant, si es dissenya un sistema d'esterilització en continu sobre la base de condicions ideals de flux, l'èxit d'aconseguir un determinat nivell d'esterilització disminueix considerablement.

Encara que s'han proposat diversos models per a conèixer el vertader comportament d'un sistema d'esterilització en continu sota distribució de temps de residència, el disseny de l'esterilització en continu pot realitzar-se mitjançant l'aplicació del model de dispersió axial, en el qual la desviació del comportament ideal es caracteritza per un coeficient de dispersió axial. Si s'aplica un balanç de microorganismes en estat estacionari a un volum diferencial de la conducció:

$$D_z \frac{d^2n}{dz^2} - v \frac{dn}{dz} - kn = 0 \quad \text{Eq. 3.17}$$

on D_z és el coeficient de dispersió axial; n , la concentració de microorganismes; z , la distància fins a l'entrada de la conducció isoterma; k , la constant de destrucció tèrmica, i v , la velocitat mitjana del fluid en la conducció.

L'equació anterior (Eq. 3.17) es pot escriure de forma adimensional si es considera $\bar{n} = n/n_0$ i $\bar{z} = z/L$, on n_0 representa la concentració inicial d'organismes contaminants en el sistema i L , la longitud total de la conducció:

$$\frac{D_z n_0}{L^2} \frac{d^2\bar{n}}{d\bar{z}^2} - v \frac{d\bar{n}}{d\bar{z}} - kn_0\bar{n} = 0 \quad \text{Eq. 3.18}$$

multiplicant cadascun dels termes per $L^2/(D_z \cdot n_0)$:

$$\frac{d^2\bar{n}}{d\bar{z}^2} - Pe \frac{d\bar{n}}{d\bar{z}} - Pe \cdot N_r \cdot \bar{n} = 0 \quad \text{Eq. 3.19}$$

on $N_r = k \cdot L/v$ és el mòdul adimensional de *Dhamkoler* que representa la velocitat de destrucció tèrmica. La solució d'aquesta equació diferencial dona el valor de la relació N/N_0 a l'eixida del sistema d'esterilització en continu en funció de N_r per a diferents valors del mòdul de *Pecllet*. La representació gràfica d'aquesta solució es presenta en la Figura 3.12. Aquesta gràfica proporciona el nivell d'esterilitat aconseguit per a un determinat valor de *Pe* i de la velocitat de destrucció, N_r .

Si es desitja dur a terme l'anàlisi d'un sistema en funcionament i determinar el grau d'esterilitat aconseguit, partint de les dades de v , k , L i D_z es determinen els valors de *Pe* i N_r a partir de la corresponent definició i, mitjançant la Figura 3.12, s'obté el valor de N/N_0 i amb això, el nombre de supervivents N assolit. Si el que es desitja és dimensionar el sistema d'esterilització (ço és, determinar la longitud del conducció isoterma, L), caldrà procedir per prova-error, a partir de les dades de v , k i D_z , fixant la relació N/N_0 en el valor desitjat fins a obtenir el valor de L que complisca els requeriments.

De la Figura 3.12 es dedueix que per a valors molt grans de *Pe* ($Pe = \infty$), és a dir, quan es pot considerar flux de pistó, les condicions són més favorables per al disseny de sistemes d'esterilització en continu, ja que permeten reduir la longitud necessària per a aconseguir un determinat grau d'esterilització. No obstant això, resulta difícil en la pràctica aconseguir el flux de pistó ideal, per la qual cosa per a realitzar un disseny acurat caldrà informació sobre la dispersió axial, D_z .

El valor de la dispersió axial per a un determinat sistema depèn del nombre de *Reynolds* i de la geometria de la conducció. En la Figura 3.13 es mostra una correlació empírica que permet determinar D_z . En aquesta figura es representa en ordenades la relació $D_z/(v \cdot D)$, on v és la

velocitat mitjana del fluid i D , el diàmetre de la conducció; i en abscesses el mòdul de Reynolds, Re , que es defineix com:

$$Re = \frac{D\rho v}{\mu} \quad \text{Eq. 3.20}$$

on D : diàmetre de la conducció.

ρ : densitat del medi.

v : velocitat mitjana del fluid en la conducció.

μ : viscositat del medi.

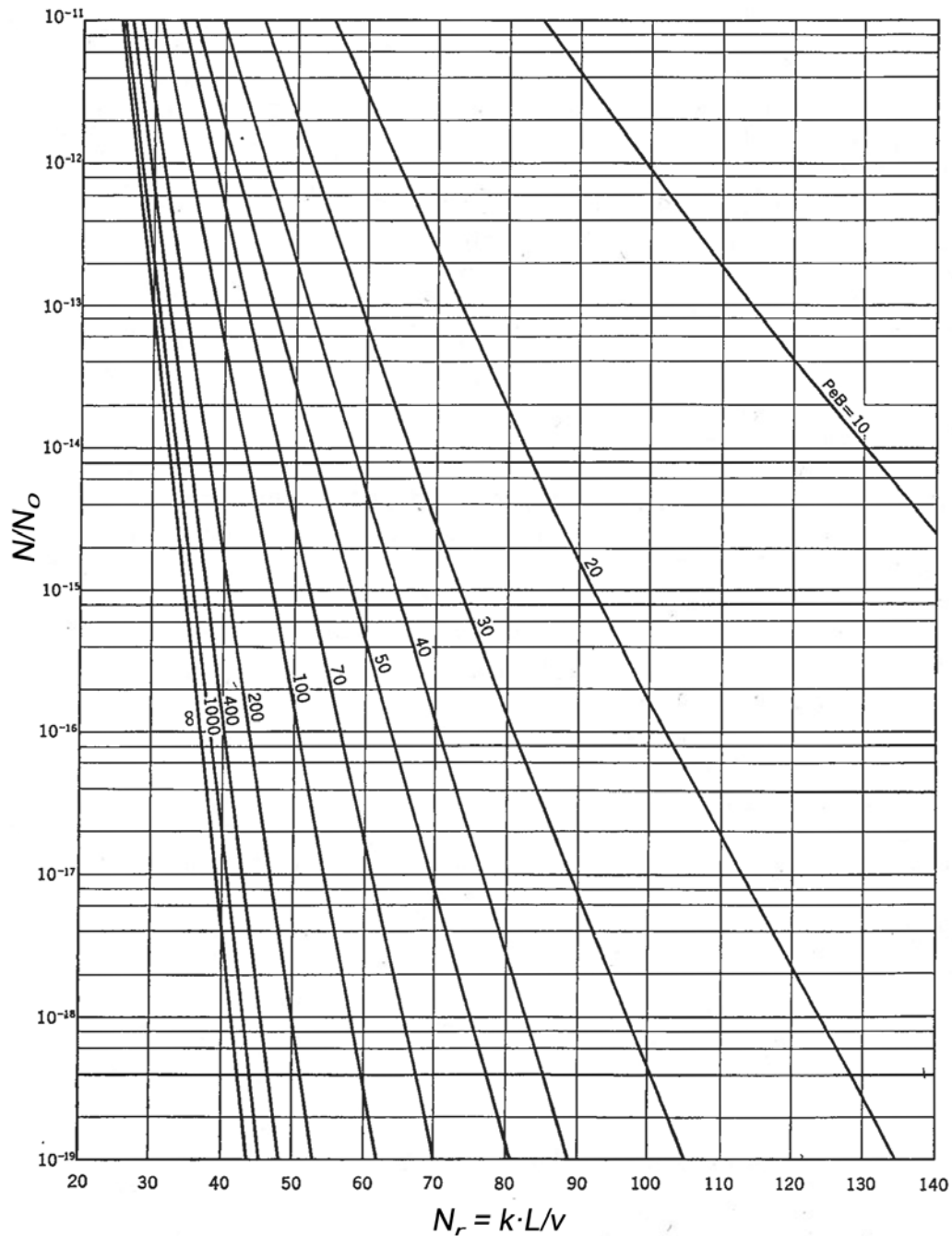


Figura 3.12. Efecte del flux en la destrucció tèrmica de microorganismes per a diferents velocitats de destrucció (Aiba, S. i col., *Biochemical Engineering*).

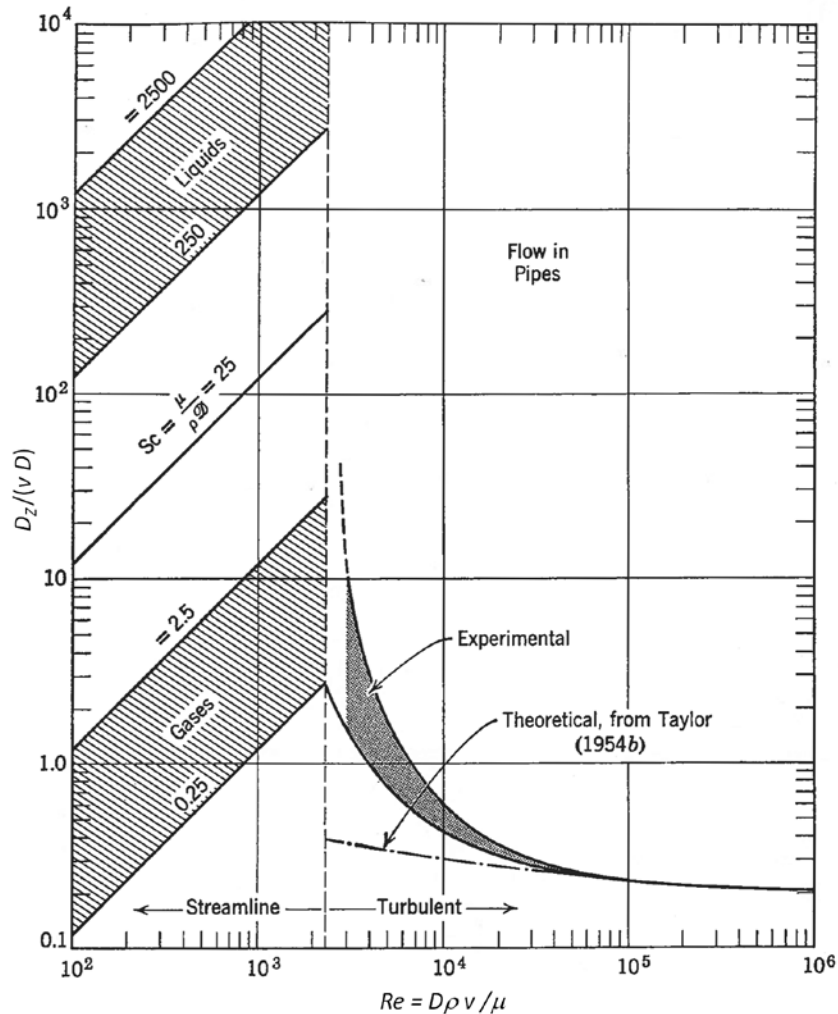


Figura 3.13. Correlació de la dispersió axial de fluids circulant en conduccions de secció circular. (Levenspiel, O., *Chemical Reaction Engineering*).

3.2.2 Filtració

La filtració difereix d'altres mètodes d'esterilització pel fet que els microorganismes no moren, sinó que són eliminats físicament. Cal dur a terme una esterilització del muntatge i del filtre abans que puguin ser utilitzats per a dur a terme l'esterilització d'un medi líquid o gasós. Hi ha dos tipus de mitjans per a la filtració: els filtres profunds i els filtres de superfície (membrana). Tots dos es fabriquen en grandàries que abasten des dels petits, de laboratori (<100 mL/h), fins als que s'usen en plantes industrials (>1000 L/h).

Filtres profunds:

Els filtres profunds o filtres tipus *Seitz* estan elaborats amb materials fibrosos o en pols, pressionats o units, en una capa relativament gruixuda a fi de formar una trama de canals interconnectats de grandària variable. Es fabriquen en fibra de vidre, cotó i cel·lulosa. Durant l'ús les partícules penetren al filtre i són atrapades com a resultat d'un conjunt de factors: intercepció directa per les fibres, impacte inercial, difusió i efectes electrostàtics. D'aquesta manera, el diàmetre mitjà de porus pot ser major que el del menor dels microorganismes que és capaç d'eliminar. Com més profund és el filtre, més eficaç, però també la resistència a

fluir, caracteritzada per la caiguda de pressió que genera, és superior i, per tant, el cost d'operació.

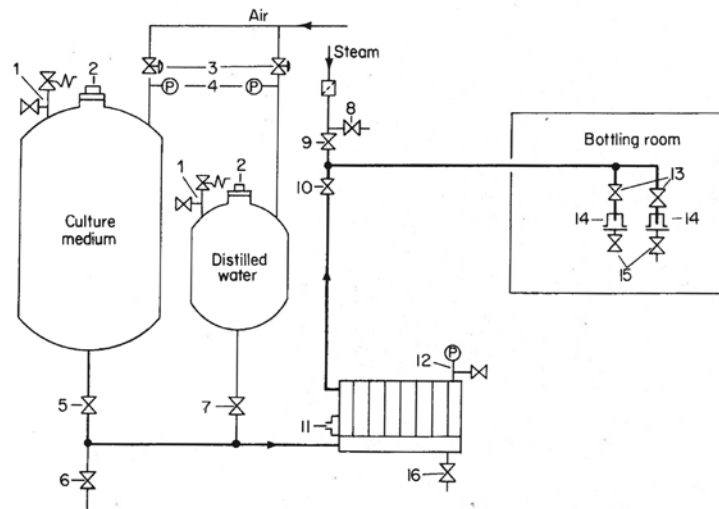


Fig. 2.26. Schematic arrangement of sterile filtration unit. (Telling, Stone and Maskell, 1966.) (1) Pressure relief and vent valves; (2) vessel charging hole with screw plug; (3) constant pressure regulator; (4) pressure gauge; (5) media inlet valve; (6) media line purge valve; (7) distilled water inlet valve; (8) main steam condensate drain valve; (9) steam inlet valve; (10) filter outlet valve; (11) connection for remote reading pressure gauge positioned in bottling room; (12) combined sight glass, vent valve, and pressure gauge; (13) solenoid bottling valve; (14) bottling discharge point and hood; (15) hood cap and purge valve; (16) filter purge valve.

Figura 3.14. Representació esquemàtica d'un sistema de filtració profund.

(Solomons, *Materials and Methods in Fermentation*).

A nivell industrial es disposen diversos marcs en els quals es col·loca el medi filtrant i s'uneixen entre si, pressionant-los fortament, de forma similar a la instal·lació dels filtres premsa. El mitjà de filtració se suporta mitjançant una malla d'acer o plats perforats amb la finalitat de donar-li la resistència mecànica necessària. Un esquema d'una instal·lació típica es mostra en la Figura 3.14.

Els principals desavantatges associats a aquest tipus de filtració radiquen que s'han de rebutjar o reciclar les primeres fraccions de filtrat, atès que s'ha de formar prèviament tortó filtrant. El medi a filtrar pot absorbir substàncies del filtre, per la qual cosa és convenient llavar el filtre amb aigua destil·lada abans de l'esterilització. A més, amb elevades càrregues de contaminants pot no resultar eficaç. L'avantatge que presenta enfront dels filtres de membrana és que no se saturen tan fàcilment (Figura 3.15).

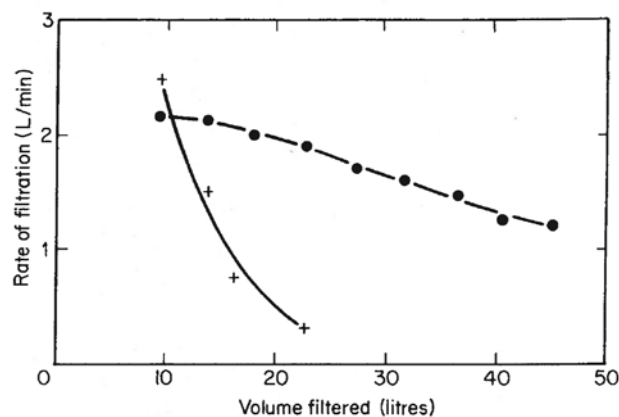


Figura 3.15. Comparació entre les velocitats de filtració mitjançant filtres tipus Seitz (●) i filtres de membrana (+). (Solomons, *Materials and Methods in Fermentation*)

Filtres de membrana:

Els filtres de membrana, més moderns que els anteriors, constitueixen una alternativa interessant. Són filtres de superfície, és a dir, els microorganismes no penetren a l'interior del filtre, i encara que es fabriquen amb diferents materials, el fet que necessiten ser esterilitzats tèrmicament fa que la majoria hagen de ser d'èsters de cel·lulosa. Les grandàries de porus en els quals es fabriquen són molt variables (0,01-14 μm). Els porus, de l'ordre de 10^8 porus/cm², solen ocupar un 65-80% de la superfície. Normalment es trien tenint en compte que la grandària del porus siga de l'ordre o inferior al diàmetre del menor microorganisme que es desitja eliminar.

La velocitat de filtració a través d'aquests filtres depèn de la diferència de pressió aplicada, viscositat, grandària de porus, etc. Per a aconseguir velocitats de filtració elevades es necessita una gran superfície de membrana. En qualsevol cas, la velocitat de filtració disminueix a mesura que les partícules biològiques oclouen els porus. Mitjançant l'ús de prefiltrats és possible reduir la càrrega sobre la superfície i, per tant, augmentar la vida del filtre.

En la Taula 3.6 s'indiquen les velocitats de filtració típiques per a filtres *Millipore* (RU) i *Sartorius* (EUA). S'observa que els primers permeten obtenir una velocitat de filtració major en l'interval de diàmetres de porus entre 0,2 i 0,6 μm , que són els normalment emprats per a l'esterilització del medi. Aquests filtres també poden emprar-se per a l'esterilització de gasos ja que, a causa dels canvis electrostàtics que tenen lloc en el filtre, es retenen partícules menors que la grandària de porus nominal.

Taula 3.6. Velocitats de filtracions típiques per a filtres de membrana.
(Solomons, *Materials and Methods in Fermentation*).

Sartorius				Millipore			
	<i>D porus</i> (μm)	Aigua*	Aire**		<i>D porus</i> (μm)	Aigua*	Aire**
				MF.SC	8,0	850	55
MF.500	5,0	1100	7,0	MF.SM	5,0	540	35
MF.250	2,0	440	2,7	MF.SS	3,0	400	20
MF.150	1,0	300	1,5	MF.RA	1,2	300	15
MF.125	0,9	225	1,5	MF.AA	0,8	212	11
MF.100	0,8	150	0,65	MF.DA	0,65	150	10
MF.50	0,6	65	0,40	MF.HA	0,45	64	4,5
MF.30	0,3	25	0,22	MF.PH	0,3	40	3,7
MF.15	0,27	14	0,13	MF.GS	0,22	21	2,5
MF.14	0,2	4,5	0,08	MF.VC	0,10	2,0	0,40
MF.12	0,15	1,6	0,06	MF.VM	0,05	1,0	0,31
MF.10	0,10	0,6	0,03	MF.VF	0,01	0,2	0,22

* velocitat de filtració d'aigua en mL/(min·cm²)

** velocitat de filtració d'aire en L/(min·cm²)

Les membranes estan suportades sobre un suport rígid, tal i com es mostra en la Figura 3.16. Normalment, a escala industrial es fa servir un conjunt entre 5 a 30 plats connectats entre si.

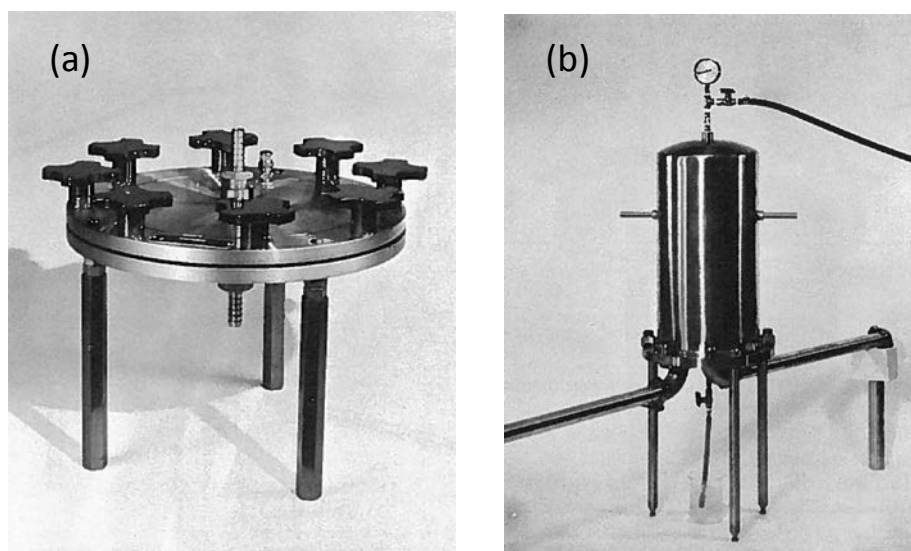


Figura 3.16. Filtre de membrana: (a) individual, (b) multifiltre.
(Solomons, *Materials and Methods in Fermentation*).

3.3 ESTERILITZACIÓ D'AIRE

Els processos aerobis de fermentació necessiten grans aportacions d'aire al cultiu, entre 0,5 i 1,5 *vvm* (volum d'aire per volum de bioreacció i minut) que, evidentment, ha de ser estèril. En la Taula 3.7 s'indiquen una sèrie de bacteris i espores bacterianes que habitualment estan presents en l'aire. A més, es poden trobar llevats, fongs i virus. La grandària d'aquests microorganismes varia entre l'escala de 10^{-3} μm a 100 μm . No obstant això, els organismes menors són adsorbits per les partícules de pols, amb la qual cosa solen ser eliminats conjuntament amb les partícules de pols en una etapa anterior a l'esterilització mateixa. Els microorganismes que s'han de separar durant l'etapa d'esterilització tenen una grandària compresa entre 0,5 i 1 μm . Pel que fa a la concentració, encara que varia segons una distribució del tipus *Poisson*, sol estar en l'ordre de $10^3 - 10^4$ partícules/ m^3 . Aquesta concentració és extraordinàriament baixa si es compara amb la neteja d'aire en la indústria, on una càrrega de 0,9 – 1,4 mg/m^3 es considera una càrrega baixa.

Taula 3.7. Espècies típiques de bacteris i espores de bacteris presents en aire.
(Aiba, S. *et al.*, *Biochemical Engineering*)

Bacteris	Amplària (μm)	Llargària (μm)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1,0 – 1,5	1,0 – 2,5
<i>Bacillus cereus</i>	1,3 – 2,0	8,1 – 25,8
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,5 – 0,7	1,8 – 3,3
<i>Bacillus megaterium</i>	0,9 – 2,1	2,0 – 10,0
<i>Bacillus mycoides</i>	0,6 – 1,6	1,6 – 13,6
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5 – 1,1	1,6 – 4,8
<i>Micrococcus aureus</i>	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0
<i>Proteus vulgaris</i>	0,5 – 1,0	1,0 – 3,0
Espores		
<i>Bacillus megaterium</i>	0,6 – 1,2	0,9 – 1,7
<i>Bacillus mycoides</i>	0,8 – 1,2	0,8 – 1,8
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5 – 1,0	0,9 – 1,8

Per a esterilitzar l'aire a escala de laboratori se solen emprar taps de cotó. No obstant això, a escala industrial han d'utilitzar-se mètodes més sofisticats. Encara que totes les tècniques emprades per a l'esterilització del medi es poden utilitzar per a esterilitzar aire, el tractament tèrmic és impracticable des del punt de vista econòmic, alhora que ineficaç, a causa de la baixa eficàcia en la transmissió de calor en l'aire en comparació amb la transmissió en medis líquids. Així, habitualment s'empra la filtració (amb materials fibrosos o a través de membranes) com a tècnica d'esterilització.

Fins a la Segona Guerra Mundial, s'havia emprat quasi exclusivament la fibra de cotó com a element filtrant. A mesura que es van començar a produir antibiòtics a gran escala, la fibra de vidre va substituir la de cotó, ja que ofereix una menor caiguda de pressió a través seu, a banda que resulta menys propensa a humitejar-se o a cremar. Els filtres fibrosos moderns són cilindres fabricats amb microfibrilles de borosilicat enllaçat en una malla de polipropilè en el qual les capes augmenten en finesa i densitat des del centre a l'exterior. Amb aquest disseny es pot esterilitzar un cabal d'aire de 3 m³/s amb una caiguda de pressió de 0,1 bar.

Des que es van introduir els filtres de membrana de polivinil-alcohol (PVA) recoberts amb resina, d'una grandària de porus de 20-30 µm, ha estat possible que la seua llargària siga menor que la dels fibrosos per a la mateixa operació.

Un aspecte molt important en referència a l'eficàcia del filtre és la humitat de l'aire d'entrada, ja que si és massa elevada, la presència de gotes d'aigua en el filtre el converteixen en poc fiable.

Normalment, com a etapa prèvia a la filtració es fa servir la inactivació tèrmica, que consisteix a aprofitar la calor generada en la compressió de l'aire prèvia al seu ús en sistemes biotecnològics. Així, una fracció dels microorganismes presents en l'aire són destruïts durant el temps de residència en la conducció d'eixida, aïllada tèrmicament, fins que arriba al sistema de filtració.

Els criteris de disseny per a la filtració d'aire a escala industrial són molt importants, ja que un sobredimensionament durà aparellat uns costos addicionals d'inversió i, sobretot, un augment de les necessitats energètiques per tal de vèncer les pèrdues de pressió a través del llit de filtració. Com a criteri de disseny per a l'esterilització d'aire, s'aconsella un valor de $N = 10^{-3}$.

TEMA 4

CANVI D'ESCALA EN BIOREACTORS

4.1	Anàlisi general del canvi d'escala en bioprocessos	2
4.1.1	Etapas en el canvi d'escala	3
4.2	Desenvolupament de l'inòcul	5
4.3	Esterilització del medi.....	5
4.4	Aeració-agitació.....	6
4.4.1	Potència d'agitació per unitat de volum	7
4.4.2	Coeficient volumètric de transferència d'oxigen.....	8
4.4.3	Esforç tallant.....	10
4.4.4	Temps de mescla	11
4.4.5	Cabal impulsat per l'agitador	12
4.4.6	Nombre de <i>Reynolds</i>	12
4.4.7	Comparació entre criteris.....	12
4.5	Anàlisi de règim i <i>scale-down</i>	14

4.1 ANÀLISI GENERAL DEL CANVI D'ESCALA EN BIOPROCESSOS

De manera general, el canvi d'escala consisteix en la instal·lació i operació d'un equip a escala industrial, de forma que el seu disseny i condicions d'operació estan basats en part en dades obtingudes experimentalment a partir d'un sistema de menor volum. És ben conegut que en la indústria química, els processos comercials s'han de basar en dades experimentals, obtingudes a nivell de laboratori i planta pilot. En el cas de les reaccions bioquímiques, aquestes dades encara són més necessàries, ja que generalment es tracta de processos més complexos.

El canvi d'escala en bioreactors és un procés de complexitat elevada, en el qual, en funció de l'escala d'operació, poden aparèixer diferents fenòmens que controlen la velocitat global del procés. Així, cal tenir en consideració que no hi ha una metodologia de canvi d'escala que es pugui aplicar de forma universal. Al llarg del tema es discutirà la necessitat d'una experimentació prèvia, els problemes que genera un escalat i els criteris i mètodes emprats per a procedir a un canvi d'escala correcte.

Les reaccions biocatalitzades (també les químiques) es desenvolupen a una velocitat que és independent de la grandària del reactor i de la seua geometria. No obstant això, la velocitat de reacció està afectada per processos físics de transport de matèria, energia i quantitat de moviment que, ara sí, estan controlats per l'estructura i grandària del reactor. Així, en dur a terme un canvi d'escala, es buscarà una similitud entre els processos. La base del concepte de similitud es fonamenta en una relació lineal com la següent:

$$m_2 = k \cdot m_1 \quad \text{Eq. 4.1}$$

de forma que entre les dues magnituds independents de dues instal·lacions, la de petita escala o sistema model (m_1) i la de gran escala que es vol dissenyar (m_2), s'estableix una relació de proporcionalitat (k) que s'anomena factor d'escala. Normalment, la teoria de similitud no es podrà aplicar a totes les variables implicades en el sistema, de manera que una tasca important serà destriar les que seran clau per al canvi d'escala. Un exemple senzill ens pot il·lustrar aquesta dificultat inherent al canvi d'escala, relacionada amb la impossibilitat de aplicar el mateix factor d'escala a diferents paràmetres: es tracta de predir la profunditat d'un vòrtex generat en un tanc agitat sense plaques deflectores en funció de la velocitat de l'agitador a partir de l'observació de un petit tanc pilot. Si s'analitza el fenomen, es conclourà que els dos tancs (petit i gran) presentaran el mateix comportament si tenen el mateix valor dels mòduls adimensionals de *Reynolds* (Re) i *Froude* (Fr), tot mantenint la similitud geomètrica:

$$Re = \frac{D_i^2 N_i \rho}{\mu} \quad Fr = \frac{N_i^2 D_i}{g} \quad \text{Eq. 4.2}$$

tenint en compte que D_i és el diàmetre de l'agitador i N_i , la velocitat d'agitació, si es volen mantenir els dos mòduls adimensionals a les dues escales, s'haurà de complir, per tal de mantenir Fr constant:

$$\frac{N_{i2}}{N_{i1}} = \sqrt{\frac{D_{i1}}{D_{i2}}} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Si, a més, es vol mantenir el mòdul Re constant:

$$\frac{\mu_2}{\rho_2} = \frac{\mu_1}{\rho_1} \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{3/2} \quad \text{Eq. 4.4}$$

per tant, la similitud total (necessària per a reproduir el vòrtex en les dues escales) no és possible en tant que les Eq. 4.3 i Eq. 4.4 no es poden complir simultàniament si es treballa amb el mateix líquid ($\rho_1 = \rho_2$ i $\mu_1 = \mu_2$). Així, si es fixa el valor de Re , llavors el Fr serà més alt en el tanc petit i, per tant, el vòrtex serà més profund.

Encara que durant l'operació de canvi d'escala pot aparèixer una varietat de problemes menors com, per exemple, toxicitat de l'antiescumant, presències de traces de metalls, etc., les tres dificultats principals que sorgeixen a l'hora de realitzar un canvi d'escala d'un procés bioquímic estan relacionades amb:

- *Desenvolupament de l'inòcul*: a escala industrial apareixen problemes relacionats amb possible degeneració del cultiu i el canvi en les condicions ambientals que no es donen a nivell de laboratori.
- *Esterilització del medi*: la presència d'impureses o la major gravetat del tractament tèrmic són alguns dels problemes que apareixen en tractar amb grans volums de medi a escala industrial.
- *Aeració-agitació*: hi ha una gran quantitat de paràmetres que es poden veure afectats per aquest binomi, tant pel que fa referència a la transferència d'oxigen com a la homogeneïtzació en el si del bioreactor. Així, l'augment d'escala pot donar lloc a canvis ambientals com ara:
 - Disponibilitat de nutrients
 - pH
 - Temperatura
 - Transferència d'oxigen i concentració d'oxigen en dissolució
 - Efecte de cisallament
 - Concentració de diòxid de carboni dissolt i velocitat d'eliminació
 - Producció d'escumes

Tots aquest paràmetres es veuen afectats per l'aeració i l'agitació: els tres primers estan relacionats amb el grau d'homogeneïtzació del medi, mentre que els altres estan influenciats pel cabal d'aire introduït al sistema, l'agitació i la transferència d'oxigen.

Com es presentarà seguidament, hi ha moltes variables que poden influir tant en l'agitació com en l'aeració en un sistema, com ara: velocitat de rotació del rodet, geometria de l'agitador, cabal d'aire, deflectors, etc.

4.1.1 Etapes en el canvi d'escala

La finalitat del canvi d'escala és la selecció de les condicions de disseny que assegurin que l'efecte de les diferents variables sobre un procés és el mateix en sistemes de diferent grandària. Amb això, es pretén que s'obtinguen rendiments, productivitats i qualitat de productes similars. La complexitat del procés i el nivell previ de coneixement solen fixar el factor d'escala, que serà més gran com més seguretat i experiència es tinga en el canvi d'escala del procés estudiat. En processos amb un coneixement previ baix, se sol prendre com a factor segur el 10. En reactors químics s'arriben a utilitzar factors de 50-80.000. Pel que fa als processos biotecnològics, els majors factors d'escala s'utilitzen en el disseny d'estacions depuradores d'aigües residuals.

Un canvi d'escala implica normalment les següents quatre etapes, de manera que en cadascuna d'elles només s'empra una grandària de fermentador:

1. Erlenmeyer (50-1.000 mL)

2. Bioreactors de laboratori (5-20 L)
3. Bioreactors pilot (50-5.000 L)
4. Bioreactors de producció (25.000 L)

Tot seguit es justifica la necessitat de cadascuna de les etapes prèvies i s'indica la informació que es pot obtenir a partir de cadascuna.

Erlenmeyer

Es tracta de l'escala en la qual s'inicia qualsevol bioprocés. És una etapa molt versàtil que permet avaluar la influència de moltes variables diverses en un període curt de temps. En aquesta escala s'estableixen les condicions òptimes relacionades amb substrats, nutrients, tipus de microorganismes o biocatalitzador, temperatura, etc., per tal d'aconseguir la generació òptima del producte desitjat.

En el cas de cultius aerobis, el mètode habitual d'aeració es realitza a partir d'una senzilla agitació mecànica, de manera que l'oxigen és aportat al medi de cultiu per transferència directa a través de la superfície del líquid, que es renova constantment. Per tant, en aquesta etapa l'aeració no sol ser restrictiva del procés de creixement.

Bioreactor de laboratori

En aquesta etapa, la grandària dels bioreactors permet l'ús del mateix inòcul que el que s'usa en l'etapa anterior. Així, sense que es presenten els problemes que el desenvolupament de l'inòcul produeix en el canvi d'escala, es podrà estudiar l'efecte d'altres variables. Es poden emprar diversos bioreactors simultàniament i obtenir així un gran nombre de dades en poc temps.

En aquesta etapa s'estudia l'efecte de determinats paràmetres que no es poden investigar en Erlenmeyer, com el control de pH, l'aeració contínua, l'agitació, els sistemes d'alimentació en continu, etc. Així, el control de pH permet l'examen crític de la seua influència. També es pot usar un ampli interval de velocitats d'aportació d'oxigen i monitoritzar la concentració d'oxigen dissolt a partir de la instrumentació disponible.

Bioreactor pilot

El canvi d'escala intenta mantenir-se a nivell de laboratori sempre que siga possible, per raons de tipus pràctic i econòmic. Quan el coneixement del procés és incomplet o es requereixen quantitats del producte relativament importants (per a la seua comercialització a petita escala, test de toxicitat, etc.), se solen utilitzar plantes de més grandària, anomenades unitats de demostració o plantes pilot.

Aquesta etapa permet estudiar els següents aspectes:

- El procediment de desenvolupament de l'inòcul serà molt similar al del reactor de producció i radicalment diferent al de les etapes anteriors.
- El mètode d'esterilització també serà diferent al de les etapes anteriors, de manera que una acurada experimentació en planta pilot permetrà dissenyar un cicle adequat d'esterilització industrial.
- L'escala pilot es pot utilitzar per a comprovar els resultats obtinguts a nivell de laboratori, però emprant les matèries primeres que s'utilitzaran a escala industrial.
- Finalment, les plantes pilot resulten molt aconsellables d'utilitzar associades a la planta industrial en operació, per tal d'estudiar els possibles efectes que els canvis en les condicions d'operació tenen sobre el procés.

4.2 DESENVOLUPAMENT DE L'INÒCUL

El desenvolupament de l'inòcul en un procés de fermentació a escala industrial implica l'ús d'un procediment diferent del que s'ha fet servir en el laboratori ja que:

- Necessita un major nombre d'etapes o transferències.
- Com a mínim una de les etapes s'ha de dur a terme en un fermentador agitat.

Les dues principals causes de problemes en el desenvolupament de l'inòcul durant el canvi d'escala són la degeneració del cultiu i el canvi en les condicions ambientals.

La degeneració del cultiu és un efecte directe associat al creixement cel·lular que el canvi d'escala produeix en els processos bioquímics. Es tracta d'un fenomen relacionat amb un canvi progressiu de la genètica d'una determinada població durant el seu desenvolupament, a causa de la selecció de variants que poden aparèixer, bé per mutació, bé per estar presents en el cultiu inicial o bé per pèrdua d'informació genètica, com en el cas d'introducció de plasmidis. En aquest sentit, cal tenir en compte que el nombre de generacions necessari per arribar a una concentració final a partir d'un determinat nivell d'inòcul depèn directament del volum final del bioreactor. Per tant, en una població de cèl·lules en què hi haja un procés de generació d'una fracció no desitjada amb una determinada freqüència, la proporció final d'aquesta fracció no desitjada dependrà de l'escala a la qual es desenvolupe el procés.

Encara que el medi de cultiu emprat en el desenvolupament de l'inòcul en el fermentador de laboratori sol ser el mateix que el que es fa servir en el fermentador de producció, poden haver-hi condicions ambientals diferents, com el tipus d'esterilització o l'aeració-agitació. Afortunadament, aquestes condicions en l'etapa de desenvolupament de l'inòcul no solen ser tan crítiques com en l'etapa de producció, tenint en compte que del que es tracta és d'obtenir un creixement adient del microorganisme.

Resulta més important que l'estat metabòlic del microorganisme siga el mateix en les escales petita i gran. Resulta normal emprar grans volums d'inòcul (5-10%) de cultiu en creixement actiu, fase de creixement exponencial, per a minimitzar la durada de la fase de latència.

Atès que el moment de transferència de cultiu al fermentador de producció és important, i considerant que l'oxigen podria resultar sovint un nutrient limitant per al creixement, és important monitoritzar i enregistrar el consum d'oxigen (mitjançant tècniques de respirometria) en l'etapa de desenvolupament. Cal, per tant, transferir el cultiu quan té lloc un consum predeterminat d'oxigen, que s'ha de seleccionar de manera que el creixement siga adequat i sense que el subministrament d'oxigen siga limitant.

4.3 ESTERILITZACIÓ DEL MEDI

Una conseqüència indirecta de l'increment en l'escala d'operació és la influència en el cicle d'esterilització: els fermentadors de major volum requereixen més temps d'esterilització, ja que la intensitat del tractament depèn de la quantitat i no de la concentració de microorganismes. Com a conseqüència d'això, la qualitat del medi queda afectada per la pèrdua de compostos termolàbils, com ara les vitamines. Per aquest motiu, de vegades el canvi d'escala pot implicar canvis en la tecnologia d'esterilització aplicada, per exemple, la substitució de l'esterilització en discontinu per l'esterilització en continu.

En primer lloc, cal determinar amb precisió les condicions del cicle pel que fa a la durada i el perfil de temperatura per tal de minimitzar la desnaturalització del medi i la presència de productes no desitjats durant el procés.

Els medis de fermentació utilitzats per a la producció a gran escala són, generalment, de naturalesa complexa: freqüentment contenen matèries primeres no purificades, com ara melasses. Per tant, es pot esperar que aquests medis continguin una mescla complexa de diferents aminoàcids, proteïnes, sucres, oligosacàrids, polisacàrids, greixos, minerals, etc. Durant el tractament tèrmic no només es pot produir una pèrdua important de la qualitat nutritiva del medi, sinó també la generació de productes tòxics, ja siga per degradació tèrmica o per reacció entre els components del medi. La formació de productes tòxics es pot evitar si es coneix la naturalesa de la reacció o els productes implicats, i es procedeix a l'esterilització per separat dels components conflictius.

Per fer el canvi d'escala dels períodes d'esterilització, si per a un procés d'esterilització es necessita, per exemple, un temps d'esterilització durant el període de temperatura constant e Δt_1 :

$$\Delta t_1 = \frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{N_{01}}{N}\right) \quad \text{Eq. 4.5}$$

on N_{01} representa el nombre total de microorganismes en el reactor de menor grandària i N , el criteri d'esterilització que es vol assolir; i k és la constant cinètica de destrucció tèrmica.

Per a un fermentador que continga N_{02} microorganismes, el temps d'esterilització necessari serà:

$$\Delta t_2 = \frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{N_{02}}{N}\right) \quad \text{Eq. 4.6}$$

com que la concentració de microorganismes serà normalment la mateixa en tots dos fermentadors, la relació entre N_{01} i N_{02} serà igual a la relació entre els volums dels fermentadors:

$$\frac{N_{02}}{V_2} = \frac{N_{01}}{V_1} \rightarrow N_{02} = N_{01} \frac{V_2}{V_1} \quad \text{Eq. 4.7}$$

i per tant:

$$\Delta t_2 = \frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{N_{01} V_2}{N V_1}\right) = \Delta t_1 + \frac{1}{k} \cdot \ln\left(\frac{V_2}{V_1}\right) \quad \text{Eq. 4.8}$$

En conseqüència, un increment en un factor 10 del volum de medi de reacció ($V_2/V_1 = 10$), portarà aparellat un augment de temps d'esterilització de $\ln(10)/k$ (és a dir, $2,3/k$).

Un tractament quantitatiu similar hauria de realitzar-se per els períodes d'escalfament i refredament, però en aquest cas no resulta tan senzill, donat que caldrà considerar els perfils de temperatura-temps, que seran diferents per als fermentadors de diferent grandària.

4.4 AERACIÓ-AGITACIÓ

Encara que els criteris de canvi d'escala es poden aplicar a qualsevol tipus de bioreactor, en aquest apartat es fa referència als reactors de tanc agitat perquè són els d'ús més comú i els més estudiats en aquest aspecte. Per a dur a terme el canvi d'escala del sistema d'aeració-agitació, es fixen dos criteris de similitud. Així, molts treballs s'han basat a mantenir la similitud geomètrica ($H_L/D_T = \text{constant}$ i, al mateix temps $D_i/D_T = \text{constant}$) = i a més mantenir constant en els dos fermentadors una de les variables següents:

- Potència d'agitació per unitat de volum
- Coeficient volumètric de transferència d'oxigen

- Esforç tallant màxim
- Temps de mescla
- Número de *Reynolds*
- Cabal impulsat per l'agitador (capacitat de bombeig)

Actualment, a voltes també hi ha la possibilitat de substituir el criteri de similitud geomètrica per un altre dels enumerats. Cal insistir que la teoria de la similitud no es pot aplicar de forma simultània en tots els aspectes que intervenen en el canvi d'escala. A més, no hi ha una metodologia de canvi d'escala que es pugui aplicar de forma universal. En qualsevol cas, quan el canvi d'escala es duu a terme sobre la base d'un determinat criteri, és molt important, a més, comprovar quin és l'efecte provocat sobre les altres variables. En aquest sentit, el temps de mescla, l'esforç tallant i la velocitat de transferència d'oxigen són claus.

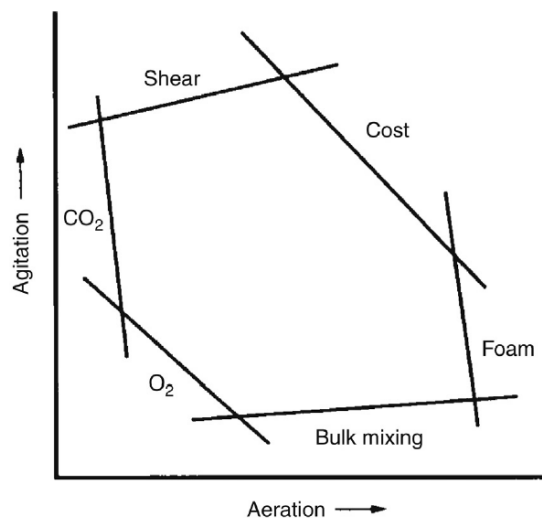


Figura 4.1. Restriccions en aeració i agitació en el canvi d'escala d'un bioreactor. (Stanbury i Whitaker, *Principles of Fermentation Technology*).

En la Figura 4.1 es mostra una representació qualitativa dels diferents factors que poden limitar la zona d'operació satisfactòria en el canvi d'escala d'un bioreactor amb aeració i agitació. Per exemple, caldrà una agitació prou vigorosa per a mantenir l'homogeneïtat del fermentador però sense causar danys al biocatalitzador per un elevat esforç tallant. Pel que fa a l'aeració, els límits estan determinats, per una banda, per l'excés en l'acumulació de diòxid de carboni o la insuficient transferència d'oxigen i, per l'altra, per la formació excessiva d'escumes o la generació de *flooding*. Per últim, una combinació d'aeració i agitació elevades pot ser econòmicament prohibitiva. Lògicament, la forma concreta de l'àrea de treball en la Figura 4.1 vindrà determinada per la fermentació concreta, ja que hi haurà sistemes en què el subministrament d'oxigen no serà primordial, mentre que es poden veure fortament afectats pels esforços tallants (i viceversa).

4.4.1 Potència d'agitació per unitat de volum

La potència subministrada a un sistema mitjançant agitació i aeració té un efecte directe sobre el seu comportament hidrodinàmic i les seues propietats de transferència de matèria. Es tracta d'un criteri de canvi d'escala que se selecciona per tal d'assegurar una transferència de matèria suficient perquè no siga limitant en el bioreactor.

Tal com s'ha vist al Tema 2, la potència absorbida per un tanc agitat està relacionada amb el nombre de potència que, per a una geometria i agitador determinats, es pot considerar

constant per a règim de circulació turbulent, quan el mòdul de Reynolds pren valors per sobre de 10^4 .

$$Re > 10^4 \rightarrow N_p = \frac{P}{N_i^3 D_i^5 \rho} = ctt \rightarrow P \propto N_i^3 D_i^5 \quad \text{Eq. 4.9}$$

Així, tal com es mostra en l'Eq. 4.9, la potència d'agitació serà proporcional al cub de la velocitat de gir de l'eix de l'agitador (N_i^3) i a la 5a potència del diàmetre del agitador (D_i^5). Com que el volum és proporcional al cub del diàmetre de l'agitador (D_i^3), tenim que la potència per unitat de volum (P/V) serà proporcional a $N_i^3 D_i^2$, de manera que un criteri de potència per unitat de volum constant implica:

$$\frac{(P/V)_1}{(P/V)_2} = \frac{N_{i1}^3 D_{i1}^2}{N_{i2}^3 D_{i2}^2} = 1 \rightarrow \frac{N_{i1}}{N_{i2}} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{2/3} \quad \text{Eq. 4.10}$$

Aquest mètode va ser emprat per al canvi d'escala de les primeres plantes de fermentació per a l'obtenció de penicil·lina a escala industrial. El principal problema que té associat és que la transferència d'oxigen no serà sempre la mateixa, considerant que hi influeixen altres paràmetres, com ara el cabal d'aire. En general, els bioreactors necessiten una potència d'aproximadament 2 kW/m^3 , encara que aquesta estimació pot variar de forma significativa amb l'escala de la fermentació. Se sol establir 5 kW/m^3 com a valor de referència màxim i, per altra banda, no se solen emprar potències més grans de 1.000 HP per eix.

4.4.2 Coeficient volumètric de transferència d'oxigen

Molt sovint es tria el coeficient volumètric de transferència d'oxigen entre la fase gas i el medi de cultiu com a magnitud a mantenir constant en el canvi d'escala. Això és degut al fet que quan es desenvolupen processos de fermentació aerobis a gran escala, el problema principal pot radicar en la transferència d'oxigen des de la fase gas. No obstant això, cal tenir en compte que un sistema adient de subministrament d'oxigen no sempre garanteix una bona mescla en el bioreactor. El coeficient de transferència d'oxigen, $k_L a$, es relaciona normalment amb els paràmetres d'agitació-aeració mitjançant l'equació:

$$k_L a = K \left(\frac{P_g}{V}\right)^\alpha (v_g)^\beta \quad \text{Eq. 4.11}$$

on α i β són factors que depenen de la grandària del reactor i K és un factor geomètric que per a fermentadors amb similitud geomètrica es pot assumir constant. En la Taula 4.1 es presenten valors empírics de α i β per a diferents grandàries de fermentador.

Taula 4.1. α i β per a bioreactors de diferents grandàries.

Volum bioreactor (L)	α	β
5	0,95	0,667
500	0,6-0,7	0,667
5000	0,4-0,5	0,5

(Atkinson, B. i Mavituna, F., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*).

Si s'accepta la similitud geomètrica i que el coeficient de transferència de matèria ha de mantenir-se constant, i considerant, tal com s'ha vist a l'apartat anterior, que:

$$\frac{P}{V} \propto N_i^3 D_i^2 \quad \text{Eq. 4.12}$$

Per altra banda, tal com s'ha vist en el Tema 2, la disminució de la potència en un sistema amb aeració estarà relacionada amb el nombre d'aeració (N_a):

$$\frac{P_g}{P} = f(N_a) ; \quad N_a = \frac{Q_g}{N_i D_i^3} \quad \text{Eq. 4.13}$$

de forma que es podrà considerar la relació P_g/P com a constant en el cas que la variació del N_a estiga circumscrita en un interval prou petit.

Per altra banda, si es considera que el cabal d'aire subministrat per unitat de volum de biorreactor (Q_g/V) és constant, es complirà que:

$$v_g \propto D_i \quad \text{Eq. 4.14}$$

de forma que si es vol mantenir constant el coeficient volumètric de transferència d'oxigen, la relació entre tots dos sistemes vindrà donada per:

$$\frac{N_{i1}^{\alpha 1}}{N_{i2}^{\alpha 2}} = \left(\frac{D_{i2}^{\alpha 2}}{D_{i1}^{\alpha 1}} \right)^{2/3} \left(\frac{D_{i2}^{\beta 2}}{D_{i1}^{\beta 1}} \right)^{1/3} \quad \text{Eq. 4.15}$$

Els principals problemes que poden aparèixer en treballar amb el criteri de k_{LA} constant són:

1. Les propietats físiques, com ara la densitat i la viscositat, poden variar durant el procés de fermentació, de manera que, en general, dependrà de l'escala i afectarà els paràmetres hidrodinàmics, especialment en fluids no newtonians. Així, k_{LA} variarà en el procés de fermentació i, per tant, caldrà elegir un valor adient.
2. Moltes voltes es fan servir valors de k_{LA} obtinguts mitjançant correlacions o mesures indirectes, cosa que pot dur a errors elevats en el canvi d'escala. Així doncs, per a fer servir aquest criteri de canvi d'escala, és molt convenient obtenir els valors de k_{LA} per mètodes experimentals.
3. En cas de treballar amb la velocitat de transferència constant ($k_{LA} \cdot \Delta c$), cal considerar que la concentració d'oxigen en dissolució en bioreactors industrials pot variar espacialment, de manera que s'haurà d'agafar una mitjana logarítmica entre la superfície i el fons del fermentador per a quantificar el gradient de concentracions.
4. Si es manté el cabal d'aire per unitat de volum, el nombre d'aeració (N_a) serà funció de la velocitat de gir el rodet, la qual cosa, si no es té en consideració, pot introduir distorsions importants en la relació P_g/P .

Com que la velocitat superficial de l'aire (v_g) augmentarà linealment amb el diàmetre (Eq. 4.14), a voltes es prefereix treballar a velocitat constant per tal d'evitar problemes associats amb la distribució deficient de l'aire en el bioreactor. En aquest cas, el cabal d'aire subministrat per unitat de volum s'haurà de disminuir de forma inversament proporcional a l'augment de l'alçària del bioreactor (H_L). Aquesta decisió farà que la dependència de la transferència d'oxigen amb la potència per unitat de volum siga més directa.

En qualsevol cas, cal emfasitzar que per a augmentar l'escala segons la transferència d'oxigen, cal prendre decisions prèvies relacionades amb la potència d'agitació i el cabal d'aire. En aquest sentit, dues alternatives han estat proposades:

Alternativa 1, segons el cabal d'aire per volum de fermentador (Q_g/V):

1. Es fixa el cabal d'aire a escala industrial, Q_g , partint de mantenir constant Q_g/V .
2. Es fixa la velocitat d'agitació, N_i , que done una potència tal que el coeficient de transferència k_{LA} siga el mateix que en l'escala reduïda. Per a aquest punt es fan servir les correlacions entre la potència absorbida i N_i i entre el coeficient i la potència.

Alternativa 2, segons la velocitat lineal a la punta de l'agitador

1. Es fixa la velocitat de gir de l'agitador per tal de mantenir la mateixa velocitat en la punta de l'agitador que en l'escala reduïda ($\pi N_i D_i$).
2. S'implementa el cabal d'aire que faça possible la mateixa transferència k_{LA} segons les correlacions disponibles.

4.4.3 Esforç tallant

La velocitat lineal a l'extrem del rodet de l'agitador, és a dir, $\pi N_i D_i$, dona una aproximació de l'esforç tallant màxim en el bioreactor, cosa que té una influència directa sobre la viabilitat de les cèl·lules, sobretot en els casos més sensibles als esforços mecànics. També presenta influència sobre la grandària de les bombolles de gas en el fermentador i dels agregats cel·lulars que es poden produir via floculació, és dir, sobre la transferència de matèria. Si es considera que la velocitat lineal es manté constant ($N_i \cdot D_i = \text{constant}$):

$$\frac{N_{i1}}{N_{i2}} = \frac{D_{i2}}{D_{i1}} \quad \text{Eq. 4.16}$$

Si es compara aquest criteri amb el de la potència per unitat de volum, s'observa que són totalment contraposats, de manera que proporciona valors molt baixos de potència d'agitació i, per tant, del coeficient de transferència, k_{LA} . Serà recomanable per al cas de cultius amb poca resistència mecànica.

Per al cas de sòlids microportadors de biocatalitzador s'ha demostrat experimentalment que els efectes perjudicials comencen a produir-se quan la longitud de *Kolmogorov*, λ (emprada per a definir la grandària dels remolins generats en l'agitació) es troba per davall de 2/3-1/3 del diàmetre dels sòlids microportadors. Una agitació excessiva donarà lloc a la formació de remolins tan petits i amb prou energia per a causar dany al biocatalitzador. Aquest plantejament també s'ha demostrat vàlid per a flòculs o cèl·lules en suspensió però, com que són molt més petits que els microportadors, els remolins també han de ser molt petits per a poder causar problemes per esforç de cisalla.

L'escala de mescla de *Kolmogorov* o escala de turbulència permet quantificar la grandària mínima dels remolins que poden formar-se en un determinat fluid:

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad \text{Eq. 4.17}$$

on λ és la longitud característica dels remolins més petits; ν , la viscositat cinemàtica (μ/ρ) i ε , la potència dissipada localment per unitat de massa (que en estat estacionari vindrà donada per la potència subministrada pel rodet de l'agitador). Com es pot deduir de l'Eq. 4.17, com més potència subministrada al líquid, més petits seran els remolins. Per a líquids de baixa viscositat, com ara l'aigua, λ es trobarà en un interval 10 -100 μm aproximadament. Així, la potència absorbida, P , serà igual al producte de ε per la massa de fluid prop del rodet, que és aproximadament igual a $\rho \cdot D_i^3$, on ρ és la densitat del fluid i D_i , el diàmetre del rodet:

$$P = \varepsilon \cdot \rho \cdot D_i^3 \quad \text{Eq. 4.18}$$

Per altra banda, de manera més general, es pot afegir que com a criteri aproximat es pren una velocitat lineal màxima a l'extrem de l'agitador al voltant de 5-6 m/s.

4.4.4 Temps de mescla

El temps de mescla, t_m , és el temps necessari per aconseguir un cert grau d'homogeneïtat a partir de l'estat completament segregat. És una variable molt útil per avaluar la velocitat general de la mescla en tancs agitats. Normalment es mesura mitjançant la injecció d'un traçador al reactor i el seguiment posterior de la concentració en un punt del tanc.

La definició del temps de mescla, t_m , depèn del grau d'homogeneïtat exigida com a referència. La definició més comunament acceptada considera el temps de mescla com el temps necessari perquè la diferència entre la concentració de traçador respecte a la final siga menor del 10% de la diferència entre la concentració inicial i la final. No obstant això, no hi ha una única definició de validesa universal, de forma que resulta important comprovar-ho en utilitzar informació de t_m bibliogràfica. Els bioreactors industrials agitats amb volums de treball d'entre 1 i 100 m³ solen tenir temps de mescla d'entre 15 i 150 segons, depenent de les condicions. Lògicament, per a una barreja ràpida i eficaç, t_m ha de ser tan petit com siga possible.

El temps de mescla dependrà de variables com la mida del tanc i l'impulsor, les propietats del fluid i la velocitat de l'agitador. La relació entre el temps de mescla i diverses d'aquestes variables s'ha determinat de manera experimental per a diferents impulsors de forma que s'ha observat que el producte adimensional $N_i t_m$ es manté constant per a circulació turbulenta ($Re > 5 \cdot 10^3$). Conceptualment, $N_i t_m$ representa el nombre de girs de l'agitador necessaris per a homogeneïtzar el líquid després de l'addició del traçador.

L'equació següent s'ha desenvolupat per tal de pronosticar el temps de mescla en tancs agitats en condicions de flux turbulent amb independència del tipus d'impulsor utilitzat:

$$N_i t_m = 5,4 \left(\frac{1}{N_p} \right)^{1/3} \left(\frac{D_t}{D_i} \right)^2 \quad \text{Eq. 4.19}$$

Aquesta expressió, l'Eq. 4.19, mostra que el temps de mescla disminueix amb l'augment de la velocitat de l'agitador i amb la disminució de la relació entre el diàmetre de bioreactor i el diàmetre de l'agitador (D_t/D_i). Cal recordar que tant el diàmetre d'impulsió com la velocitat de gir tenen una forta influència sobre els requisits de potència, de manera que no sempre resulta possible obtenir temps de mescla petits sense consumir grans quantitats d'energia. Altrament, si el temps de mescla és massa gran, poden aparèixer zones mortes que donen lloc a gradients de concentració i/o temperatura que poden provocar problemes de funcionament importants.

En conseqüència, en règim turbulent es complirà:

$$t_m \propto \frac{1}{N_i} \quad \text{Eq. 4.20}$$

i per tant, un criteri de canvi d'escala amb un temps de mescla constant implica:

$$\frac{t_{m1}}{t_{m2}} = \frac{N_{i2}}{N_{i1}} \quad \text{Eq. 4.21}$$

si es pren aquest criteri com a referència per al canvi d'escala i es compara amb el de potència per unitat de volum constant, es pot observar que proporcionarà una potència molt més elevada. Normalment, en l'augment d'escala es redueix la velocitat d'agitació, en part a causa de l'excessiva velocitat que s'empra en escala de laboratori. No obstant això, la disminució de la velocitat de gir no necessàriament ha de donar lloc a una mescla deficient malgrat l'augment del temps de mescla que sempre es produirà a escala industrial. Així i tot,

això en fluids molt viscosos i no newtonians, o en sistemes amb un gran contingut de sòlids en suspensió, la disminució de la capacitat de mescla pot afectar el funcionament del procés.

4.4.5 Cabal impulsat per l'agitador

L'acció d'un agitador (ja siga axial o radial) es pot assimilar al rodet d'una bomba en la impulsió de fluids en conduccions. És a dir, podríem conceptualitzar un agitador com una bomba sense carcassa que imprimeix una determinada velocitat de circulació al fluid i que se sol denominar "capacitat de bombeig" de l'agitador, Q_i . Per a definir aquest cabal, Q_i , en termes físics i/o mecànics es fa servir el nombre adimensional de bombeig (*pumping number*, N_Q), que relaciona la capacitat de bombeig amb la velocitat de gir i les dimensions del tanc:

$$N_Q = \frac{Q_i}{N_i D_i^3} \quad \text{Eq. 4.22}$$

S'ha vist empíricament que aquest mòdul adimensional es manté constant per a diferents tipus d'agitador per a valors de nombre de Reynolds elevats (règim turbulent). Per tant, en aquestes condicions podem assumir N_Q constant i per tant, que la capacitat de bombeig (Q_i) del sistema serà proporcional al producte $N_i \cdot D_i^3$. Com que el volum del bioreactor és proporcional a la tercera potència del diàmetre de l'agitador (d'acord amb la geometria estàndard), tindrem que la capacitat de bombeig per unitat de volum (Q_i/V) serà proporcional a la velocitat de gir de l'eix:

$$\frac{Q_i}{V} \propto N_i \quad \text{Eq. 4.23}$$

Efectivament, el temps de mescla (t_m) també es pot considerar com la relació entre el volum de líquid i el cabal impulsat per l'agitador (capacitat de bombeig). Així, les observacions fetes en el apartat anterior s'adiuen completament a la inversa de la capacitat de bombeig per unitat de volum:

$$t_m = \frac{V}{Q_i} \quad \text{Eq. 4.24}$$

4.4.6 Nombre de Reynolds

L'impacte del canvi d'escala sobre el règim del fluid en el fermentador es pot determinar via el nombre de Reynolds. Així, com que aquest mòdul és proporcional al producte $N_i D_i^2$, l'efecte sobre el règim de circulació es pot quantificar mitjançant la relació entre $N_i D_i^2$ per a cadascuna de les escales. Com que en la majoria de casos se sol treballar en règim turbulent, normalment aquest criteri no s'empra com a base del canvi d'escala, encara que resulta interessant analitzar com és afectat per altres criteris.

4.4.7 Comparació entre criteris

En la Taula 4.2 es resumeixen els principals criteris que es poden fer servir per al canvi d'escala del procés d'agitació-aeració. D'aquesta taula se'n dedueix que el criteri de *Reynolds* constant duu aparellat els mateixos problemes associats a mantenir constant l'esforç tallant i que el cabal impulsat per l'agitador (capacitat de bombeig) per unitat de volum produeix resultats idèntics al temps de mescla quan es consideren com a referència en el canvi d'escala.

Taula 4.2. Diversos criteris de canvi d'escala per a tancs geomètricament similars amb medi de fermentació i propietats físiques constants ($Re > 10^4$ i N_P constant).

Criteri		Relació
Potència per unitat de volum	$\frac{P}{V} \propto N_i^3 D_i^2$	$\frac{N_{i1}}{N_{i2}} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^{2/3}$
$k_L a$	$k_L a \propto \left(\frac{P}{D_i^3}\right)^\alpha v_g^\beta$	$\frac{N_{i1}^{\alpha 1}}{N_{i2}^{\alpha 2}} \propto \left(\frac{D_{i2}^{\alpha 2}}{D_{i1}^{\alpha 1}}\right)^{2/3} \left(\frac{D_{i1}^{\beta 2}}{D_{i2}^{\beta 1}}\right)^{1/3}$
Velocitat extrem agitador (màxim esforç tallant)	Velocitat $\propto \pi N_i D_i$	$\frac{N_{i1}}{N_{i2}} = \frac{D_{i2}}{D_{i1}}$
Temps de mescla	$t_m \propto \frac{1}{N_i}$	$N_{i1} = N_{i2}$
Capacitat de bombeig de l'agitador (Q_i)	$Q_i \propto N_i D_i^3$	$N_{i1} = N_{i2}$
Nombre de Reynolds (Re)	$Re \propto N_i D_i^2$	$\frac{N_{i1}}{N_{i2}} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}}\right)^2$

En la Taula 4.3 es presenta l'escalat d'un reactor industrial de 10 m³ a partir d'un de pilot de 80 L. Representa, doncs, un augment del volum per un factor de 125 (un factor de 5 per al diàmetre) tot conservant la similitud geomètrica. A partir d'aquesta taula se'n poden desprendre algunes conclusions interessants relacionades amb els inconvenients associats a cadascun dels criteris.

Taula 4.3. Relació entre propietats en el canvi d'escala per a diferents criteris, tot considerant similitud geomètrica (relacions H_L/D_T i D_T/D_i constants).

Propietat	Planta pilot (80 L)		Planta industrial (10 000 L)			
D_i	1	5	5	5	5	5
P	1	125	3125	25	0,2	3125
P/V	1	1	25	0,20	0,016	25
$Q_i/V (N_i)$	1	0,342	1	0,20	0,040	1
Q_i	1	42,7	125	25	5	125
$N_i D_i$	1	1,71	5	1	0,20	5
$N_i D_i^2 (Re)$	1	8,55	25	5	1	25
$t_m (1/N_i)$	1	2,92	1	5	25	1

(Aiba, S. et al., *Biochemical Engineering*).

En qualsevol cas, es recomana que una volta efectuat el disseny de canvi d'escala, es comproven els efectes sobre, almenys, tres aspectes importants: temps de mescla, esforç tallant i transferència d'oxigen. Si s'observen les resultats, es veuen efectes molt diferents en funció del criteri triat per al canvi d'escala. Per exemple, un canvi d'escala basat en mantenir constant la potència per unitat de volum incrementaria un 70% el màxim esforç tallant i el temps de mescla, un factor de 2,92. Per altra banda, el canvi d'escala basat en el temps de circulació (t_m) necessitaria un factor de 3.125 en l'increment de la potència (25 en la potència per unitat de volum).

4.5 ANÀLISI DE RÈGIM I SCALE-DOWN

Aquesta metodologia de canvi d'escala de bioreactors es basa a dur a terme, en primer lloc, una anàlisi de règim del sistema a escala industrial, en el qual es determinen els fenòmens que controlen el procés considerat. A continuació, es dissenya un bioreactor a escala de laboratori, de manera que els mecanismes que controlen el procés siguin els mateixos que en el fermentador industrial. D'aquesta manera, el procés es pot optimitzar en la instal·lació de laboratori, i els resultats d'aquest estudi es poden traslladar al disseny i operació del procés industrial. Aquests sistemes a escala reduïda també es poden fer servir per a avaluar canvis en el procés industrial i estimar-ne la resposta (velocitat de creixement, rendiment de producte, formació de subproductes problemàtics) en canvis en la composició del medi (per exemple, per canvi en el subministrador de matèries primeres), introducció de noves soques de microorganismes, canvi en el protocol d'inoculació, ús de nous antiescumants, tolerància del sistema a diferents nivells de presència de O₂ i CO₂, etc. En definitiva, es tracta de seguir el consell de Leo Baekeland, inventor de la baquelita: "Cometeu els vostres errors a escala reduïda i obtingueu els beneficis a gran escala."

El procés conceptual de l'*scale-down* es podria resumir a partir de les etapes següents:

1. Anàlisi del funcionament de bioreactor industrial.
2. Detecció dels factor limitants o colls de botella (*bottleneck*).
3. Simulació en escala reduïda del sistema amb les condicions limitants.
4. Optimització de l'operació a escala reduïda.
5. Transferència i implementació de les millores a escala industrial.

El terme "anàlisi de règim" en aquest context s'utilitza per a referir-se a l'estudi necessari per a trobar el mecanisme controlant de la velocitat del bioprocés. El mètode consisteix bàsicament a respondre a les preguntes següents: hi ha un mecanisme que controla la velocitat? Quin és? Es produirà un canvi de règim en el procés de canvi d'escala? Per a respondre a aquestes preguntes es determinen els temps característics per als diferents processos analitzats. El temps característic està relacionat de forma inversa a la velocitat a la qual es desenvolupa un mecanisme. La comparació de les constants temporals per conversions, mescla, flux, difusió, transferència de matèria, temps de residència, etc., poden donar una bona idea sobre quin és el mecanisme controlant del procés. Tot seguit es defineixen algunes de les principals constants de temps:

- Temps de mescla (t_m):

$$t_m = \frac{K_{tm}}{N_i} \quad \text{on} \quad K_{tm} = 5.4 \left(\frac{1}{N_p} \right)^{1/3} \left(\frac{D_t}{D_i} \right)^2 \quad \text{Eq. 4.25}$$

on K_{tm} és constant en règim turbulent.

- Temps de conversió (t_c):

$$t_c = \frac{C}{r} \quad \text{per exemple:} \quad \frac{S}{r_s}; \frac{C_{O_2}}{r_{O_2}} \quad \text{Eq. 4.26}$$

on C és la concentració del component considerat (per exemple, concentració de substrat, S , d'oxigen en dissolució, C_{O_2}, \dots) i r , la seua velocitat de reacció (velocitat de consum de substrat, r_s , d'oxigen en dissolució, r_{O_2} , etc.).

- Temps de creixement cel·lular (t_x):

$$t_x = \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{Eq. 4.27}$$

on μ_{max} és la velocitat específica màxima de creixement cel·lular.

- Temps de difusió (t_D):

$$t_D = \frac{L^2}{D_{ef}} \quad \text{Eq. 4.28}$$

on D_{ef} és el coeficient de difusió i L , la longitud característica del sistema.

- Temps de residència de la fase líquida (τ):

$$\tau = \frac{V}{Q} \quad \text{Eq. 4.29}$$

on V és el volum del fermentador i Q , el cabal de medi alimentat.

- Temps de transferència de matèria (t_{tm}):

$$t_{tm} = \frac{1}{k_L a} \quad \text{Eq. 4.30}$$

on $k_L a$ és el coeficient volumètric de transferència de matèria (a , superfície específica; k_L , coeficient individual de transferència).

- Transferència de calor (t_{tc}):

$$t_{tc} = \frac{V\rho c_p}{UA} \quad \text{Eq. 4.31}$$

on V , ρ i c_p són el volum, la densitat i la calor específica del medi al fermentador, respectivament. Per altra banda, U és el coeficient de transmissió de calor i A , l'àrea de transmissió.

Un exemple d'aplicació d'aquesta metodologia es pot trobar en l'estudi de l'homogeneïtat en fermentadors de tanc agitat. Encara que en escales reduïdes es pot considerar una mescla ideal en tot el volum del bioreactor, a escala industrial es poden trobar distorsions importants respecte a aquest model. Això pot tenir conseqüències directes en diferents aspectes, com ara la transferència d'oxigen. En efecte, en la Taula 4.4 es consideren les constants de temps típiques per a una fermentació amb *Aspergillus niger*. Es pot observar que per a un fermentador a escala reduïda, el temps de mescla és comparable al de la transferència d'oxigen (al voltant de 10 s). No obstant això, quan es passa a treballar en un fermentador industrial, el temps de mescla s'incrementa de forma considerable (al voltant de 100 s), mentre que el temps corresponent a la transferència gairebé és duplica (18 s). Això implica que la biomassa activa en el bioreactor estarà exposada a variacions cícliques de la concentració d'oxigen, màxima en les proximitats de l'agitador i mínima en la proximitat de les parets. Aquesta situació de variabilitat contínua pot tenir una influència crítica sobre el creixement, rendiment i productivitat del microorganisme aerobi en funció de la seua sensibilitat a les concentracions baixes d'oxigen.

Taula 4.4. Valors característics d'algunes constants de temps per a una fermentació amb *Aspergillus niger*.

Propietat	Escala reduïda	Escala industrial
Creixement cel·lular	5 h	5 h
Consum de substrat	5 h	5 h
Transferència d'oxigen	10 s	18 s
Temps de mescla	10 s	100 s

(Gòdia Casablanas, F. et al., *Ingeniería Bioquímica*).

BIBLIOGRAFIA

- ACS, American Chemical Society and RSC, Royal Society of Chemistry (1999). *The discovery and development of penicillin 1928-1945*, ACS and RSC.
- Aiba, S., Humphrey, A. E., & Millis, N. F. (1973). *Biochemical engineering*. Academic Press, Inc.
- Atkinson, B., & Mavituna, F. (1991). *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. Stockton.
- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (2018). *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill.
- Belter, P. A., Cussler, E. L., & Hu, W. S. (1987). *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*.
- Clark, D. S., & Blanch, H. W. (1997). *Biochemical engineering*. CRC press.
- Doran, P.M. (2013) *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd ed., Academic Press.
- Gòdia Casablancas, F. & López Santín, J.L. ed. (1998) *Ingeniería bioquímica*. Ed. Síntesis.
- Katoh, S., Horiuchi, J. I., & Yoshida, F. (2015). *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists*. John Wiley & Sons.
- Levenspiel, O. (1998). *Chemical reaction engineering*. John wiley & sons.
- Liu, S. (2013) *Bioprocess engineering: kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*, Elsevier.
- Liu, S. (2020). *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design*. Elsevier.
- Moberg, C.L. (1991), Penicillin's forgotten man: Norman Heatley. *Science*. 253, 5021, p. 734-735.
- Nagata, S. (1975). *Mixing: principles and applications*. Halsted press.
- Najafpour, G. (2015). *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier.
- Ragauskas, A. J., Beckham, G. T., Biddy, M. J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M. F., ... & Wyman, C. E. (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *science*, 344(6185), 1246843.
- Roffler, S.R., Blanch, H.W., Wilke, C.R. (1984) In situ recovery of fermentation products. *Trends in Biotechnology*. 2, 5, p.129-136.
- Sastry, S. K., & Simpson, R. (2013). *Chemical and Bioprocess Engineering*. Springer.
- Solomons, G.L. (1971). *Materials and Methods in Fermentation*. Academic Press.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (2017) *Principles of Fermentation Technology*, 3rd ed., Butterworth-Heinemann.

ESTUDI DE LA TRANSFERÈNCIA D'OXIGEN EN UN BIOREACTOR

Processos Biotecnològics

Màster en Enginyeria Química

Introducció

L'aeració és una operació important en els processos aerobis, bàsicament a causa de la baixa solubilitat de l'oxigen en els medis de cultiu aquosos. La concentració de saturació d'oxigen se situa en condicions normals de cultiu per sota de 10 mg/L, concentració del tot insuficient per a desenvolupar un procés aerobi. En conseqüència, l'oxigen ha de ser subministrat contínuament al sistema si es desitja mantenir una població activa, de forma que aquest oxigen ha de transferir-se des d'una fase gasosa a la fase líquida, on pot ser utilitzat per la reacció biocatalitzada. Així doncs, la velocitat de transferència d'oxigen al bioreactor ha de mantenir-se en tot moment igual o superior a la velocitat de consum de les cèl·lules.

La maximització de la productivitat és un dels objectius finals de qualsevol procés i, per tal de mantenir una alta producció per unitat de volum en un bioreactor, cal una elevada concentració de biocatalitzador. Malauradament, una alta concentració cel·lular en un sistema aerobi duu aparellat un elevat consum d'oxigen i, per tant, la transferència d'oxigen des de la fase gas al líquid de fermentació pot convertir-se en l'etapa controlant, cosa que fa fonamental l'estudi de la transferència d'oxigen.

Transferència de matèria gas-líquid

Com a conseqüència de la baixa solubilitat de l'oxigen en un medi aquós, la velocitat de transferència està limitada per la resistència en la fase líquida. Per tant, la velocitat de transferència d'oxigen per unitat de volum de bioreactor (N_A , kgO₂/m³·s), ve donada per:

$$N_A = k_L a \cdot (C_O^* - C_O) \quad (1)$$

on:

k_L : Coeficient de transferència d'oxigen en la fase líquida (m³/m²·s).

a : Relació entre l'àrea de contacte gas-líquid i el volum del reactor (m² interfície/m³ reactor).

C_O^* : Concentració d'oxigen màxima o de saturació en la fase líquida (kgO₂/m³).

C_O : Concentració d'oxigen en la fase líquida (kgO₂/m³).

Així doncs, la velocitat de transferència de matèria depèn del coeficient de transferència, de la grandària de la interfície gas-líquid i de la força impulsora que origina la diferència entre la concentració d'oxigen màxima (de saturació) i la concentració en el si de la fase líquida. La concentració de saturació, C_O^* , depèn de les condicions de pressió, temperatura i composició del medi, i normalment varia entre 7 i 9 mg/L si se subministra l'oxigen a partir d'aire. Per altra banda, tant la interfície per unitat de volum com el coeficient de transferència de matèria depenen de les condicions d'operació i de les propietats físiques del medi. La interfície dependrà del tipus i grandària de bombolles produïdes i el coeficient de transferència de matèria del flux establert en el bioreactor.

Velocitat de consum d'oxigen de la biomassa

La cinètica d'ús d'oxigen es pot relacionar amb la velocitat de creixement tot considerant el paràmetre de rendiment biomassa/oxigen:

$$r_O = -\frac{r_X}{Y_{XO}} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{XO}} \quad (2)$$

on:

Y_{XO} : Rendiment biomassa/oxigen: (kg de cèl·lules formades)/(kg O₂ aportat).

μ : Velocitat específica de creixement (s⁻¹).

X : Concentració de biomassa activa en el bioreactor (kg/m³).

Balanç d'oxigen en el bioreactor

Tenint en compte les equacions anteriors de transferència i consum d'oxigen, es pot quantificar la variació de la concentració d'oxigen en el fermentador mitjançant l'aplicació d'un balanç de matèria al sistema:

$$\frac{dC_o}{dt} = k_L a \cdot (C_o^* - C_o) + r_o \quad (3)$$

Aquesta equació relaciona la capacitat de transferència cap al reactor amb la velocitat de creixement que es pot aconseguir en el seu interior. La determinació del coeficient, $k_L a$, és essencial per a establir l'eficiència d'aeració i quantificar els efectes que les variables d'operació tenen sobre el transport d'oxigen. En aquest sentit, resulta interessant que la determinació del valor del coeficient es realitzi experimentalment en les condicions concretes en les quals es desenvolupa l'operació.

Determinació de $k_L a$.

Si en la fermentació aeròbia objecte d'estudi es pot suposar que la població microbiana es manté constant durant el període d'estudi experimental, la velocitat de consum d'oxigen (r_o) es mantindrà constant i, per tant, es podrà determinar el producte $k_L a$ mitjançant els següents procediments:

- A. Admetre que s'aconsegueix un estat quasi-estacionari per a la concentració d'oxigen dissolt de manera que es compleix:

$$\frac{dC_o}{dt} = k_L a \cdot (C_o^* - C_o) + r_o = 0 \quad (4)$$

on C_{oe} representa la concentració d'oxigen estacionària en el fermentador. Per tant:

$$k_L a = \frac{-r_o}{(C_o^* - C_{oe})} \quad (5)$$

- B. Utilitzar directament l'equació general del balanç d'oxigen (3) que permet, a partir de la variació de la concentració d'oxigen dissolt en funció del temps, calcular $k_L a$ a partir de la següent expressió:

$$C_o = C_o^* - \frac{1}{k_L a} \left(\frac{dC_o}{dt} - r_o \right) \quad (6)$$

de forma que si es representa C_o en funció de $dC_o/dt - r_o$, s'obté una línia recta de pendent $-1/(k_L a)$ amb una ordenada en l'origen igual a C_o^* .

Influència de l'agitació sobre $k_L a$

La transferència de matèria des de la fase gas a la fase líquida en un tanc agitat és molt complexa. En particular, l'agitació exerceix una gran influència sobre la grandària de bombolla, temps de retenció de bombolla en el bioreactor i mesclat del líquid. Tots aquests factors tenen un gran influència sobre el valor del coeficient de transferència de matèria.

Generalment, $k_L a$ es pot correlacionar amb aquests factors segons l'expressió:

$$k_L a = b \cdot \left(\frac{P}{V} \right)^c (Q_g)^d \quad (7)$$

on:

b, c, d: són constants que depenen de les dimensions del bioreactor, dimensions de l'agitador, propietats del fluid...

P/V : Potència d'agitació per unitat de volum de bioreactor.

Q_g : Cabal volumètric de gas, normalment aire.

Per a una fermentació que conté com a caldo de cultiu un fluid newtonià, la potència d'agitació és funció de la velocitat d'agitació, N_i . Llavors, per a un cabal d'aire constant, el coeficient de transferència de matèria pot relacionar-se amb la velocitat d'agitació segons el següent equació:

$$k_L a = \alpha \cdot (N_i)^\beta \quad (8)$$

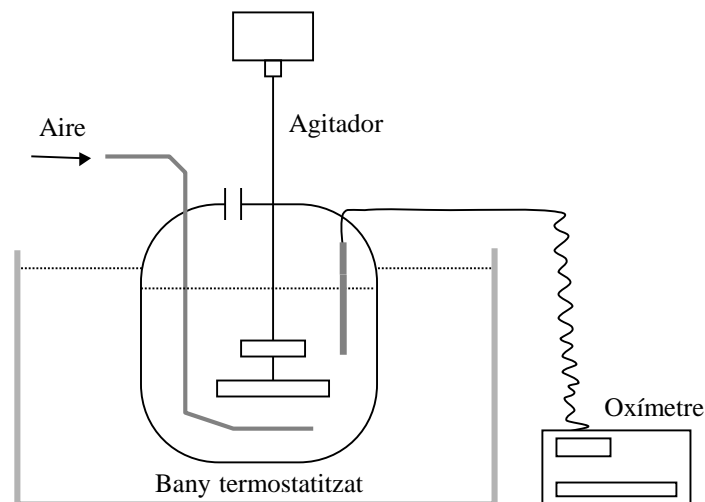
on:

α , β : constants del model.

N_i : velocitat d'agitació (rpm).

Equip experimental i procediment

Amb la finalitat de determinar el coeficient de transferència d'oxigen, s'ha dut a terme una sèrie d'experiments en un bioreactor de 4 L equipat amb un elèctrode d'oxigen dissolt, control de temperatura, agitador de paleta i difusor d'aire. En la figura es mostra un esquema del sistema emprat.

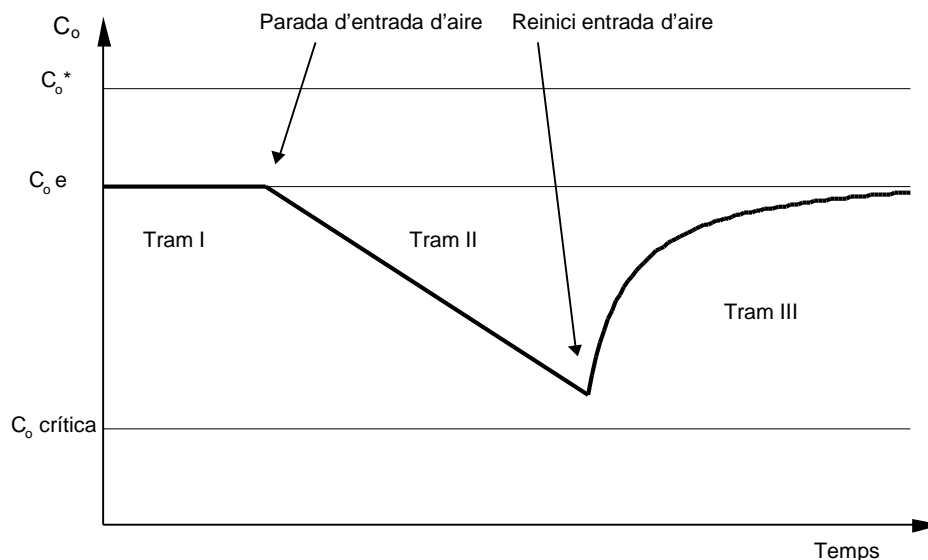


Tots els experiments s'han realitzat a partir d'una solució original de glucosa amb una concentració de 60 g/L. S'ha procedit de la següent manera:

1. S'introdueixen 3.500 ml del medi (dissolució de glucosa i nutrients) en el bioreactor.
2. Es col·loca l'elèctrode d'oxigen en el fermentador (prèviament calibrat).
3. S'injecta aire al bioreactor amb un cabal constant, perfectament conegut, i es connecta l'agitador en la posició adequada.
4. S'espera un temps suficient perquè se sature la dissolució i es determina la concentració d'oxigen dissolt en les condicions de saturació (C_o^*) a partir de la lectura de l'elèctrode.
5. S'introdueixen en el bioreactor 1,5 g/L de llevat dissolt en una solució de glucosa (500 ml). Una vegada afegida la suspensió de llevat al fermentador, s'espera el temps necessari per a l'acimatació (fase de latència), la qual cosa es manifesta en la constància de la concentració d'oxigen dissolt (C_{oe}).

6. Es tanca el subministrament d'aire al sistema i es registra l'evolució de la concentració d'oxigen dissolt en funció del temps, fins que la concentració d'oxigen dissolt se situe entre un 25 i un 35% del de saturació.
7. S'obri de nou l'entrada d'aire amb el mateix cabal inicial i es continua el registre de la concentració d'oxigen dissolt. Es realitza el seguiment de l'evolució de la concentració fins que s'acosta de nou al punt màxim.

A partir dels resultats obtinguts, i mitjançant el procediment descrit, es pot obtenir a partir de la representació de la concentració d'oxigen dissolt en funció del temps, una gràfica similar a la de la figura.



En la figura es poden observar els següents trams:

- **Tram I.** Correspon al període en el qual la concentració d'oxigen dissolt és manté pràcticament constant i el terme d'acumulació (dC_o/dt) es pot considerar negligible, de forma que de l'equació (3) resulta:

$$k_L a \cdot (C_o^* - C_{oe}) = -r_o \quad (9)$$

És a dir, la velocitat d'aportació externa d'oxigen és igual a la de consum cel·lular (generació negativa). A partir de l'equació (9) es pot calcular $k_L a$ segons el procediment A.

- **Tram II.** Representa el període en el qual es tanca l'entrada d'aire, la velocitat de transferència d'oxigen és zero i per tant l'equació (3) es redueix a:

$$\frac{dC_o}{dt} = r_o \quad (10)$$

La concentració d'oxigen en dissolució presenta amb el temps una evolució lineal amb un pendent negatiu, corresponent a la velocitat de consum d'oxigen per unitat de volum del bioreactor (r_o).

- **Tram III.** Correspon amb el reinici de l'entrada d'aire al sistema. En aquest cas es complirà l'equació (3), on cal considerar tots els termes de manera que calculant el

valor del pendent de la corba per als diferents valors de la concentració d'oxigen dissolt, es podrà determinar el valor del coeficient de transferència segons el procediment B.

Aquesta metodologia es repetirà sistemàticament per a quatre velocitats d'agitació diferents.

Càlculs i discussió

A partir dels registres de la concentració d'oxigen en el bioreactor obtinguts en laboratori (veure Apèndix), es durà a terme el càlcul del coeficient de transferència d'oxigen k_{LA} (mitjançant els dos procediments descrits) per a diferents velocitats d'agitació.

S'estudiarà la influència de la velocitat d'agitació sobre k_{LA} . Els valors experimentals de k_{LA} obtinguts s'ajustaran a l'equació (8) per tal de determinar els valors dels paràmetres α i β .

Discussió de resultats:

1. Comenteu raonadament els valors de k_{LA} obtinguts per tots dos procediments.
2. Què implicaria una variació no lineal al tram II de la figura anterior (C_o vs. t)? Quina podria ser-ne la causa?
3. Per què no s'utilitzen velocitats d'agitació molt més altes, que donarien lloc a una transferència de matèria més favorable?
4. Es podria dir, amb la informació disponible, que els paràmetres obtinguts mitjançant l'ajustament lineal a l'equació (6) corresponen amb el seu significat físic?

COL·LECCIÓ D'EXERCICIS PRÀCTICS

Problema 2.1

Un bioreactor amb un diàmetre i una alçària de líquid d'1,4 m està agitat amb una turbina *Rushton* de diàmetre 0,5 m situada a 0,35 m sobre el fons del fermentador i ajustada a una velocitat de gir de 75 rpm. El caldo de fermentació està sotmès a aeració amb un cabal de 0,28 m³/min. En un moment determinat es produeix un problema en els rodaments de l'eix, de forma que la velocitat de gir ha de ser reduïda a 45 rpm.

- En les condicions normals d'operació, el gas quedarà completament dispersat en el bioreactor?
- Després de la reducció de la velocitat de gir, es produirà inundació de l'agitador (*flooding*)? L'agitador treballarà a màxima càrrega?

Problema 2.2

Un bioreactor d'1,2 m de diàmetre s'utilitza per a desenvolupar en discontinu un cultiu de *Brevibacterium flavum* en condicions aeròbies. El reactor s'agita mitjançant una turbina *Rushton* de 0,4 m de diàmetre. Al principi de la fermentació, quan els requeriments d'oxigen del cultiu i la concentració cel·lular són relativament baixos, l'agitador es fa funcionar a una velocitat de 110 rpm, la mínima necessària per a dispersar completament les bombolles d'aire. Cap al final de la fermentació, quan la densitat cel·lular és alta, es decideix duplicar el cabal volumètric d'aire per a subministrar més oxigen.

- Es produirà *flooding* o l'impulsor estarà a la màxima càrrega sota aquestes condicions?
- Quina velocitat d'agitador es necessita per a aconseguir una dispersió completa del gas amb el nou cabal d'aeració?

Problema 2.3

En un bioreactor d'1 m de diàmetre i 0,8 m d'alçària de líquid es desenvolupa un cultiu en suspensió de cèl·lules manipulades de ratolí. La velocitat d'agitació és d'1,5 rps. El bioreactor té 4 bafles verticals amb una amplària del 10% del diàmetre. L'aire s'injecta en la base del agitador amb un cabal de 0,3 vvm (volum de gas per volum de líquid per minut). La densitat del medi és de 1.000 kg m⁻³ i la viscositat, d'1,4 cP. La impulsió es duu a terme mitjançant una turbina *Rushton* de 0,4 m de diàmetre.

- L'aire es dispersa eficaçment en aquest sistema?
- El flux és turbulent?
- Quina potència cal per a l'agitació?

Problema 2.4

Un fermentador agitat s'utilitza per a cultivar *Streptomyces cinnamonensis* per a la producció de l'antibiòtic monensina. El diàmetre del tanc i l'alçària del líquid són d'1,1 m. La densitat del caldo és de 1.000 kg m⁻³ i la viscositat, d'15 cP. La mescla es realitza amb una turbina *Rushton* amb un diàmetre de la meitat del bioreactor. El cabal d'aire és de 0,66 vvm (volum de gas per volum de líquid per minut).

- Quina velocitat d'agitador es requerirà per a la dispersió total del gas?
- Si es pot assumir una reducció del 50% en la necessitat de potència quan s'introdueix aire al bioreactor, quina potència caldrà per a la dispersió total del gas?

Problema 2.5

Un bioreactor cilíndric de 3 m de diàmetre amb quatre deflectors (10% del diàmetre) té muntada una turbina *Rushton* amb un diàmetre d'1/3 del bioreactor. El nivell de líquid és igual

al diàmetre del tanc i la densitat del fluid és d'aproximadament 1 g cm^{-3} . El reactor s'utilitza per al cultiu d'un organisme anaerobi. Es pot assumir un comportament newtonià del caldo de fermentació. A mesura que creix la població cel·lular, la viscositat del brou augmenta.

- (a) La velocitat de l'impulsor s'ajusta a 90 rpm. Compareu la potència d'agitació necessària quan la viscositat és:
- Aproximadament la mateixa que l'aigua.
 - 100 vegades la de l'aigua.
 - 2×10^5 vegades la de l'aigua.
- (b) Si la viscositat és 1000 vegades superior a la de l'aigua:
- A quina velocitat s'haurà d'ajustar l'impulsor per a treballar en règim turbulent?
 - Quina potència caldrà per a treballar en règim turbulent?
 - Quina potència per unitat de volum caldrà per a règim turbulent? Resulta raonable poder subministrar aquesta potència? Raoneu la resposta.

Problema 2.6

Les cèl·lules fúngiques que formen agregats es cultiven en un bioreactor de 10 m^3 de $2,4 \text{ m}$ de diàmetre equipat amb una turbina *Rushton* d' $1,2 \text{ m}$ de diàmetre operada a 50 rpm. La separació entre l'impulsor i el fons del fermentador és de $0,6 \text{ m}$. La densitat del medi de fermentació és de 1.000 kg m^{-3} i la viscositat, de $0,055 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. La densitat i el diàmetre dels grups cel·lulars són 1.035 kg m^{-3} i $600 \mu\text{m}$, respectivament. La concentració de cèl·lules en el fermentador arriba al 40% w / w. Determineu si les cèl·lules es mantindran en suspensió en aquestes condicions d'operació.

Problema 2.7

S'estan estudiant bacteris immobilitzats sobre partícules de grava per a la bioremediació de bifenils policlorats (PCB, *polychlorinated biphenyls*). Les cèl·lules es cultiven en una solució aquosa de densitat 1.000 kg m^{-3} i viscositat de $0,8 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ en un bioreactor de 400 litres de diàmetre $0,8 \text{ m}$. El reactor s'agita amb una turbina *Rushton* de diàmetre d'un terç del diàmetre del bioreactor, posionat a una distància del fons del reactor igual a $1/4$ del diàmetre. Les partícules tenen un diàmetre mitjà de $250 \mu\text{m}$, la densitat de grava és d' $1,9 \text{ g cm}^{-3}$ i la concentració de partícules és del 15% en pes. L'oxigen s'introdueix al bioreactor mitjançant un flux d'aire de $0,5 \text{ vvm}$. Si la velocitat de l'impulsor s'ajusta al mínim necessari per a mantenir les partícules en suspensió, es podrà assolir una dispersió completa del gas?

Problema 2.8

Cal instal·lar una turbina *Rushton* en un bioreactor 2 m de diàmetre equipat amb quatre deflectors (10% del diàmetre d'amplada). El bioreactor s'opera amb un nivell de líquid igual al diàmetre i s'utilitza per a organismes de cultiu que requereixen un cabal d'aire d' $1,5 \text{ vvm}$. La densitat de brou és propera a $1,0 \text{ g cm}^{-3}$ i la viscositat és de $0,9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$. Els vostres col·legues vos suggereixen que dissenyeu el sistema per a un impulsor de diàmetre un terç del diàmetre del tanc, ja que aquesta és la pràctica estàndard de l'empresa, però un diàmetre d'impulsió de la meitat del diàmetre del bioreactor també seria una possibilitat.

- Quina velocitat d'agitador es necessitaria per a evitar el *flooding* si $D_i = 1/3 D_T$?
- Quina velocitat d'agitador es necessitaria per a evitar el *flooding* si $D_i = 1/2 D_T$?

El cap de planta està preocupat pels costos d'operació associats a l'agitació i vos suggereix utilitzar l'impulsor més petit ($D_i = 1/3 D_T$) per a minimitzar la despesa energètica:

- Tenint en consideració les condicions de funcionament determinades a (a) i (b) per a evitar el *flooding* de l'impulsor, quin sistema necessitaria menys potència? Es pot assumir que

la caiguda de potència associada als gasos és pràcticament igual per als dos impulsors. Quin dels dos impulsors recomanaríeu?

Problema 2.9

Un bioreactor de diàmetre i alçària de líquid d'1,15 m s'agita utilitzant una turbina de quatre paletes inclinades de 0,36 m de diàmetre operada a 200 rpm. Al sistema s'injecta un cabal d'aire de $0,036 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. En aquestes condicions, el nombre de potència en règim turbulent de l'impulsor amb gasos és d'aproximadament 1,0. El líquid del dipòsit té una densitat d' 1 g cm^{-3} i viscositat 1 cP.

- És probable que l'impulsor estiga inundat (*flooding*) o treballant a màxima càrrega? Quines aproximacions cal prendre per la resposta?
- Quina és la potència subministrada per l'impulsor?
- Quina és la potència subministrada pel cabal de gas?
- Segons la vostra opinió, aquest sistema d'agitació seria eficaç per la dispersió de gasos?

Problema 2.10

Un brou de fermentació conté 40% en pes de cèl·lules amb una dimensió mitjana $10 \mu\text{m}$ i densitat $1,04 \text{ g cm}^{-3}$. Una hèlix marina de diàmetre 30 cm s'utilitza per mantenir agitada la suspensió. La densitat i la viscositat del medi són aproximadament els mateixos que l'aigua. La fermentació es realitza en condicions anaeròbies en un recipient de 75 cm de diàmetre.

- Estimeu la velocitat d'agitació requerida per a suspendre completament les cèl·lules.
- Quina potència és necessària per a la suspensió cel·lular?

Teniu previst millorar aquest procés de fermentació utilitzant una nova soca cel·lular immobilitzada en una matriu de plàstic porós en partícules de 2 mm de diàmetre i una densitat de $1,75 \text{ g cm}^{-3}$. En aquest cas, la concentració de partícules requerida per a dur a terme una fermentació comparable és del 10% en pes.

- Com canvia el sistema cel·lular immobilitzant la velocitat d'agitació i la potència necessària per a la suspensió de partícules?

Problema 2.11

Per al creixement de llevat s'utilitza un bioreactor de 50 m^3 ($H_L/D_t = 2,5$; volum de treball 60%) equipat amb dos agitadors de turbina de pala plana. El bioreactor opera contínuament amb una velocitat de dilució de $0,3 \text{ h}^{-1}$. El creixement del microorganisme segueix una cinètica de *Monod* ($\mu_{max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ i $K_S = 2 \text{ kg m}^{-3}$). La concentració de sucre (glucosa) a l'entrada és de 50 kg m^{-3} .

En el bioreactor s'introdueix aire i s'agita amb 0,5 vvm i 60 rpm, respectivament. El rendiment de biomassa basat en glucosa és de 0,5 g cèl·lula (seca) per gram de glucosa consumida. La densitat i viscositat del brou són 1.200 kg m^{-3} i $0,02 \text{ N s m}^{-2}$, respectivament.

En aquestes condicions, quin és el factor limitant en la velocitat global del procés: la transferència de matèria o la reacció biocatalitzada?

DADES.- Per a tancs agitats i airejats la correlació entre el coeficient volumètric de transferència de matèria i les variables d'operació pot expressar-se per l'equació:

$$k_L \cdot a = 2 \cdot 10^{-3} (P_g/V)^{0.7} \cdot (v_g)^{0.2}$$

$$k_L \cdot a \equiv (\text{s}^{-1})$$

$$(P_g/V) \equiv (\text{W m}^{-3})$$

$$v_g \equiv (\text{m s}^{-1})$$

Hughmark (1980) va correlacionar per a aquest tipus de reactor amb turbina de paleta plana la potència amb introducció d'aire i sense:

$$P_g/P = 0,10 (N_i V/Q)^{0,25} \cdot (N_i^2 \cdot D_i^4 / g \cdot D \cdot V^{2/3})^{-0,20}$$

- On: N_i = velocitat de rotació del agitador (rps)
 V = volum de líquid (m^3)
 Q = cabal volumètric de gas ($m^3 s^{-1}$)
 D_i = diàmetre de l'agitador (m)
 g = acceleració gravetat ($m s^{-2}$)
 D = amplària de la paleta del impulsor (m)

Concentració d'oxigen en saturació en el medi a la temperatura de treball: $6,8 \text{ mg L}^{-1}$.

Problema 2.12

Les dimensions d'un bioreactor equipat amb dos jocs de turbina estàndard de paletes planes amb quatre bafles són:

- Diàmetre del fermentador, $D_t = 3 \text{ m}$
 Diàmetre del agitador, $D = 1,5 \text{ m}$
 Amplària del bafle, $\omega_b = 0,3 \text{ m}$
 Alçada del nivell de líquid, $H_L = 5 \text{ m}$

La densitat i viscositat del brou de fermentació són:

$$\mu = 0,02 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\rho = 1.200 \text{ kg m}^{-3}$$

La velocitat de rotació de l'agitador és de 60 rpm i la velocitat d'entrada d'aire és de 0,4 vvm.

Calculeu:

- Els requisits de potència sense aire, P .
- Els requisits de potència amb entrada d'aire, P_g .
- Hold-up*, H .

Problema 2.13

Es vol dur a terme una fermentació bacteriana amb un bioreactor que conté un medi de cultiu de densitat $1,2 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}$ i viscositat $0,02 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

El brou es manté en suspensió amb l'ajut d'un agitador que gira a una velocitat de 80 rpm. S'introdueix aire mitjançant un difusor a una velocitat de 0,4 vvm.

El bioreactor, de 60 m^3 , amb un 80% de volum útil, està equipat amb dos jocs de turbina de paleta plana, quatre bafles i presenta les següents dimensions:

- diàmetre del fermentador = 3,5 m
 diàmetre del agitador = 1,3 m
 amplària de paleta = 0,3 m

Per a poder dissenyar el procés global de fermentació cal determinar:

- Requisits de potència per al sistema no airejat.
- Requisits de potència per al sistema airejat.
- Coeficient volumètric de transferència de O_2 .

Amb aquesta informació disponible, calculeu quina velocitat de creixement cel·lular podria esperar-se per a una població microbiana amb una concentració de $2,6 \text{ g L}^{-1}$ amb els següents paràmetres cinètics i rendiment:

$$\begin{aligned}\mu_{max} &= 0,5 \text{ h}^{-1} \\ K_{O_2} &= 3,2 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1} \\ Y_{XO} &= 2 \text{ g cel g-O}_2^{-1}\end{aligned}$$

Dades i notes:

Per a aquest agitador de pales planes es compleix la següent equació:

$$K_L \cdot a = 2 \cdot 10^{-3} \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.6} (v_g)^{0.667}$$

on: $K_L \cdot a$ = coeficient volumètric de transferència de O_2 (s^{-1})
 (P_g/V) = potència per unitat de volum ($CV \text{ m}^{-3}$)
 v_g = velocitat superficial del gas ($cm \text{ min}^{-1}$)

$$1CV = 735 \text{ W}$$

En les condicions de treball, la concentració de saturació d'oxigen és de $7,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Problema 3.1

Es vol esterilitzar en un bioreactor un litre d'un medi que es troba inicialment a una temperatura de 30°C i conté $6 \cdot 10^9$ cèl·lules/mL. L'escalfament es duu a terme amb injecció de vapor d'aigua saturat a 120°C amb un cabal de $5 \cdot 10^{-3}$ kg/min durant 55 minuts. A partir d'aquest moment es deixa refredar, i s'obté el següent perfil de temperatura amb el temps:

t (min)	55	57	58	63	70	102	130	140
T (°C)	120	115	110	100	90	60	40	30

La constant cinètica de destrucció tèrmica de microorganismes depèn de la temperatura d'acord a la següent equació:

$$k = 7,94 \cdot 10^{38} \cdot \exp\left(\frac{-34700}{T}\right)$$

on k s'ha expressat en min^{-1} i T en K.

Calculeu el grau d'esterilització assolit.

Dades: Densitat del medi: 1.000 kg m^{-3}
 Entalpia del vapor respecte al medi: 2.250 kJ kg^{-1}
 Capacitat calorífica del medi: $5,0 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$
 Viscositat del medi: $0,001 \text{ Pa}\cdot\text{s}$

Problema 3.2

Per a esterilitzar 50 litres de medi de cultiu en un bioreactor, es fa servir una resistència elèctrica amb una potència calorífica de 7.125 W. El medi presenta una densitat de 1.200 kg m^{-3} i una capacitat calorífica de $6,0 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Inicialment es troba a una temperatura de 25°C.

La contaminació inicial del sistema s'ha quantificat en $5 \cdot 10^9$ cèl·lules/mL.

La constant de destrucció tèrmica de l'agent contaminant en funció de la temperatura ve donada per:

$$k = 7,0 \cdot 10^{35} \cdot \exp\left(\frac{-32000}{T}\right)$$

on k s'ha expressat en min^{-1} i T en K.

El perfil de refredament del procés és:

t (min)	0	5	10	15	20	25	40	80	120
T (K)	393	386	380	371	357	336	320	310	300

Calculeu el temps de manteniment a 120°C que caldria per a assegurar un grau d'esterilització de 10^{-5} .

Problema 3.3

Es vol dur a terme l'esterilització d'un fermentador amb un volum de medi de 40 m^3 (25°C) mitjançant injecció directa de vapor sec saturat. El recompte típic de bacteris és de $5 \cdot 10^{12}$ cèl·lules per m^3 , que cal reduir a una probabilitat de supervivència d'1 entre 1000. El vapor (345 kPa, a pressió absoluta) s'injecta amb un cabal de 5.000 kg h^{-1} fins que el medi arriba a una temperatura de 122°C. Es pot assumir que la quantitat de calor perduda durant el temps

de manteniment és negligible. Després es duu a terme la refrigeració del bioreactor fins a una temperatura final de 30°C (amb un cabal d'aigua de 10 m³ h⁻¹ a 20°C). El bescanviador té un àrea de 40 m² i un coeficient global de transmissió de calor (U) de 2.500 kJ h⁻¹ m⁻² K⁻¹. La constant de destrucció de les espores en el medi està caracteritzada per un coeficient d'Arrhenius de 5,7 · 10³⁹ h⁻¹ i una energia d'activació de 2,834 · 10⁵ kJ kmol⁻¹. La calor específica i densitat del medi tenen uns valors de 4,187 kJ kg⁻¹ K⁻¹ i 1000 kg m⁻³, respectivament. Determineu el temps de manteniment requerit.

Nota: podeu estimar l'entalpia del vapor respecte al medi a partir de taules de vapor de bibliografia com ara:

<http://www.spiraxsarco.com/Resources/Pages/steam-tables.aspx>

Problema 3.4

Es volen esterilitzar 60 · 10³ litres d'un medi que conté 10⁵ microorganismes per mL fins a assolir un grau d'esterilització de 10⁻³ en un període de 40 minuts. L'esterilització es duu a terme mitjançant un sistema continu tubular amb injecció de vapor que consta de dues unitats que operen en paral·lel.

A quina temperatura s'haurà d'injectar el vapor si s'admet que el medi assoleix pràcticament de forma instantània aquesta temperatura?

Dades:

Longitud dels tubs de cada unitat = 50 m.

Diàmetre del tub = 0,155 m.

Propietats físiques del medi:

- Densitat = 1.000 kg m⁻³
- Viscositat = 1,10⁻³ Pa s
- Capacitat calorífica = 4,18 kJ kg⁻¹ K⁻¹

Constant cinètica de destrucció tèrmica:

$$k = 7,94 \cdot 10^{38} \cdot \exp\left(\frac{-34700}{T}\right) \quad (k \text{ en min}^{-1}, T \text{ en K})$$

Problema 3.5

Es vol esterilitzar un medi de cultiu de 4.500 litres amb una presència d'agent contaminant de 10³ microorganismes per mL, en un període de 60 minuts.

L'esterilització es realitzarà en un esterilitzador continu tubular amb injecció de vapor.

Quina longitud serà necessària per a l'esterilitzador continu si es vol obtenir una probabilitat d'èxit en l'esterilització de 0,9999?

Amb els resultats obtinguts, comenteu raonadament si l'esterilitzador funcionaria en condicions lògiques. En cas negatiu, quines variables podrien canviar-se per a millorar-lo?

Dades:

Diàmetre del tub = 0,3 m

Constant cinètica de destrucció tèrmica a la temperatura d'esterilització:

$$k = 28 \text{ min}^{-1}$$

Propietats físiques del medi:

Densitat = 1.000 kg m⁻³

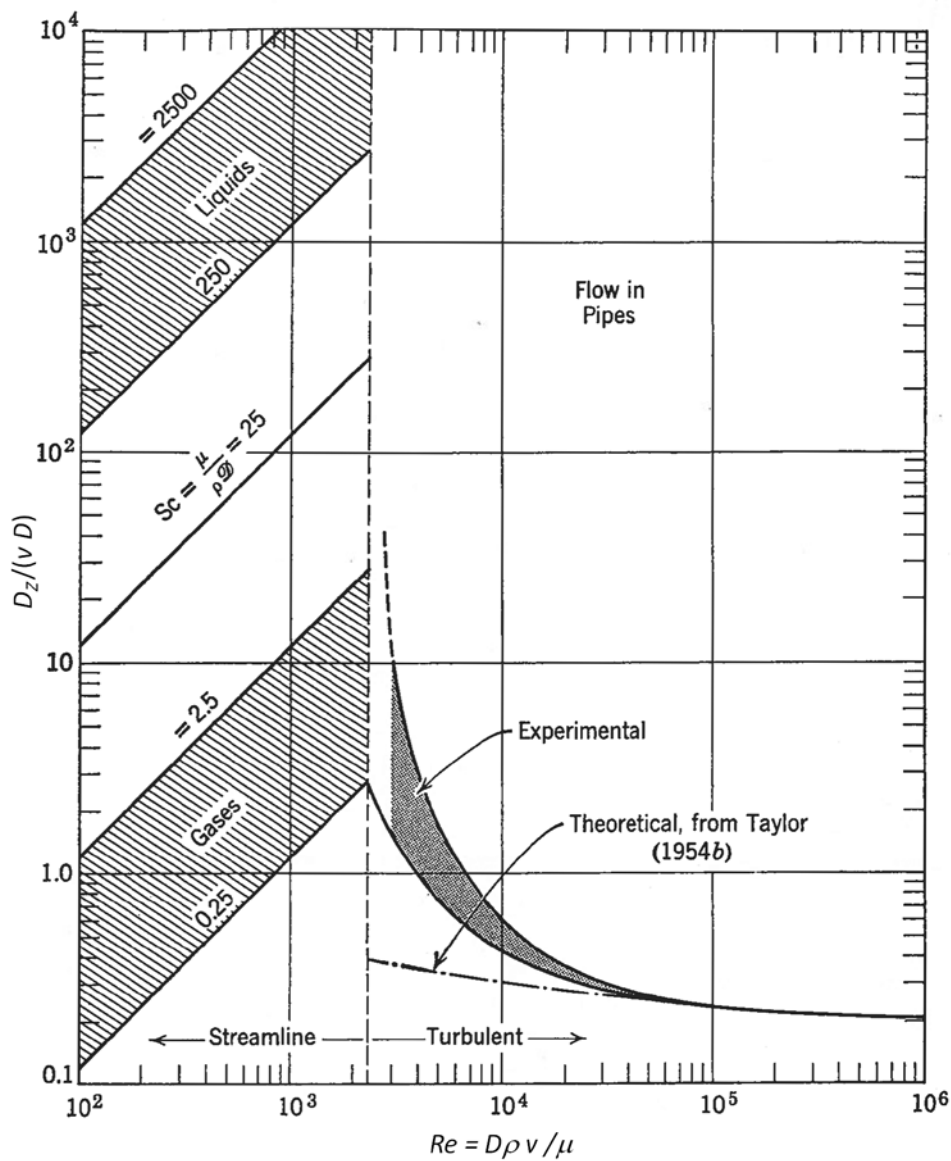
Viscositat = 1,10⁻³ Pa·s

Problema 3.6

Es desitja esterilitzar un medi de cultiu de 48 m^3 mitjançant bescanvi de calor amb vapor en un esterilitzador en continu amb un cabal de $2,0 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. El líquid conté espores bacterianes amb una concentració de $2,6 \cdot 10^{10}$ espores/ m^3 . La constant específica de mort cel·lular, k , té un valor de $13,7 \text{ min}^{-1}$ a la temperatura de treball (130°C). La conducció isoterma de l'esterilitzador té un diàmetre de 10 cm. La densitat del medi de cultiu és de 1.010 kg m^{-3} i la viscositat, de $0,0010 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Calculeu la longitud de la conducció isoterma si es considera acceptable una probabilitat de fallada de 0,001.

Realitzeu també el càlcul aproximat considerant la hipòtesi de flux de pistó. Compareu i comenteu les diferències entre ambdós casos (amb i sense aproximació de flux de pistó).



Problema 4.1

Un caldo de fermentació amb una viscositat de 0,010 Pa s i una densitat de 1.000 kg m^{-3} s'agita en un fermentador de $2,65 \text{ m}^3$ amb deflectors mitjançant una turbina *Rushton* de 0,5 m de diàmetre i una velocitat d'agitació d' 1 s^{-1} . El diàmetre del reactor és igual a l'alçada de líquid. Calculeu el temps de mescla i la capacitat de bombeig de l'agitació.

Problema 4.2

Es fan servir sòlids microportadors de $120 \mu\text{m}$ de diàmetre per a cultivar cèl·lules amb ADN recombinant per a produir hormona del creixement (somatotropina). Es proposa utilitzar un rodets de turbina de 6 cm de diàmetre per a homogeneïtzar el cultiu en un tanc agitat de 3,5 litres. La suspensió de reacció té una densitat aproximada de 1.010 kg m^{-3} i una viscositat de $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$. Calculeu la velocitat d'agitació màxima permissible per a evitar que les turbulències generen dany a les cèl·lules com a conseqüència de l'esforç tallant.

Problema 4.3

Considerem el canvi d'escala a partir d'un fermentador de laboratori d'1 L a un altre a escala de producció geomètricament similar, de 30.000 gal. El bioreactor de laboratori té una relació d'alçada a diàmetre $H_L/D_T = 2,5$. L'impulsor (turbina *Rushton*) té un diàmetre equivalent al 33% del diàmetre del tanc de reacció. La velocitat de gir s'ajusta a 400 rpm. Determineu les dimensions del bioreactor de producció i la velocitat de gir si es considera:

- Potència per unitat de volum constant.
- Temps de mescla constant.
- Esforç tallant constant.
- Mòdul de Reynolds constant.

Problema 4.4

Per tal d'assegurar unes condicions de completa turbulència mitjançant agitació amb turbina, el mòdul de Reynolds ha de ser superior a 10^4 . Considerant que un fermentador a escala de laboratori amb un diàmetre i una alçada de líquid de 15 cm té una mescla de reacció amb una densitat igual a la de l'aigua i està agitat per un impulsor amb un diàmetre de 5 cm operat a 800 rpm, determineu:

- El límit superior de la viscositat del caldo si es vol assolir plena turbulència.
- El temps de mescla.

Es decideix augmentar l'escala del sistema mantenint la velocitat lineal a la punta de l'agitador (mateix esforç tallant màxim) i aplicar un factor d'escala de 15 pel que fa a la dimensió del diàmetre del bioreactor i de l'agitador en referència al sistema de laboratori.

- Amb aquestes condicions, quin factor d'escala s'està aplicant en referència al volum de reacció?
- Com afectarà el canvi d'escala a la màxima viscositat que pot tenir el caldo per a mantenir les condicions de turbulència completa?
- Com afectarà el canvi d'escala a la potència d'agitació necessària per unitat de volum?
- Com afectarà el canvi d'escala al temps de mescla?

Problema 4.5

Un fermentador a escala pilot de diàmetre i alçada de líquid de 0,5 m està equipat amb quatre deflectors i una turbina de disc corbada tipus Scada 6SRGT ($N_p = 1,5$) amb un diàmetre d'un terç del diàmetre del bioreactor. La densitat del caldo de cultiu és de 1.000 kg m^{-3} i la viscositat és de 5 cP. Les condicions òptimes de cultiu es proporcionen al fermentador a escala pilot quan la velocitat de l'agitador és de 185 rpm. Després de completar els estudis pilot, es

construeix un fermentador a escala de producció amb una capacitat de 6 m^3 i geomètricament similar al bioreactor a escala pilot i amb el mateix tipus d'impulsor.

- (a) Quin és el consum d'energia d'agitació en el fermentador a escala pilot?
- (b) Si el fermentador a escala de producció s'implementa de manera que la potència consumida per unitat de volum és la mateixa que en escala pilot, quin és el requisit de potència després del canvi d'escala?
- (c) Per a les condicions de (b), quina és la velocitat de l'agitador?
- (d) Si, en comptes de la potència per unitat de volum, es manté la mateixa velocitat a la punta de l'impulsor que en planta pilot, quina serà la velocitat de gir de l'agitador després del canvi d'escala?
- (e) Per a les condicions en (d), quina potència es requereix després de l'ampliació d'escala?

Problema 4.6

A partir d'un fermentador pilot amb una alçària de líquid igual al diàmetre del tanc, s'escala un bioreactor de producció mantenint-ne la similitud geomètrica. El volum de treball del reactor industrial és 50 vegades més gran que el d'escala pilot. Si l'equip d'agitació es canvia d'escala d'acord amb una potència constant per unitat de volum,

- a) Quin efecte tindrà sobre el temps de mescla?
- b) I sobre la capacitat de bombeig de l'agitador?
- c) I sobre l'esforç tallant màxim?
- d) I sobre el mòdul de Reynolds?