



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio Ingeniería Bioquímica



Florina Ramírez Vives

Flor de Ma. Cuervo López

Mónica Meráz Rodríguez

Anne Claire Texier

Araceli Tomasini Campocosio

Tania Volke Sepúlveda



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dr. Rubén Román Ramos
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dr. Octavio Loera Corral
Jefe del Departamento de Biotecnología

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2013

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Av. San Rafael
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Presentación	5
Introducción	7
Reglas de laboratorio	9
Procedimientos de laboratorio	9
Materiales indispensables en cada sesión de laboratorio	9
Práctica 1. Determinación de azúcares reductores y proteínas solubles	11
Práctica 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática	17
Práctica 3. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad enzimática	21
Práctica 4. Determinación de los parámetros cinéticos de la invertasa	25
Práctica 5. Determinación de la potencia necesaria para la agitación de fluidos newtonianos y no newtonianos en reactores con y sin aireación	31
Práctica 6. Determinación del coeficiente convectivo de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y del coeficiente respiratorio de los microorganismos (Q_{O_2})	39
Práctica 7. Efecto de la aireación en cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en biorreactores	45
Práctica 8. Determinación de la distribución de tiempos de residencia (DTR) en reactores continuos	51
Anexo I.	57

Presentación

Este manual está dirigido a los alumnos de las UEA Bioquímica Microbiana Industrial, Diseño de Reactores Biológicos y Fenómenos de Transporte en Procesos Microbianos, que forman parte del plan de estudio de la carrera de Ingeniería Bioquímica Industrial impartida en la UAM-Iztapalapa.

Debido a su importancia, incluimos como primer capítulo las reglas generales de seguridad de un laboratorio. Posteriormente, se describen 8 prácticas. En cada práctica se presentan los Objetivos y una Introducción para facilitar la comprensión del tema, después se indican los Materiales necesarios y los Procedimientos a realizarse en forma de instrucciones numeradas.

En cada práctica se proponen cuadros para la recopilación de resultados. Al final de cada práctica se incluye un cuestionario que el alumno deberá resolver para integrar sus conocimientos, así como las referencias bibliográficas de apoyo para el aprendizaje.

En la parte final de este manual se incorporan los Anexos donde se describe la preparación de soluciones y medios de cultivo que se requieren para la realización de las prácticas.

Las autoras

Introducción

La realización de prácticas de laboratorio durante el estudio de la Ingeniería Bioquímica es muy importante desde el punto de vista de formación de los alumnos, ya que les ayuda a comprender mejor y reafirmar los conocimientos adquiridos en la teoría. La intención de este manual es ejemplificar los principales temas contenidos en el curso y que los alumnos puedan desarrollarlos experimentalmente, con el fin de que aprendan su funcionamiento.

El estudio de la Ingeniería Bioquímica es muy amplio y de él se desprenden muchos temas de importancia, como el estudio de las enzimas y su comportamiento, el estudio de reactores en lote y los parámetros más importantes a medir y controlar, así como los cultivos microbianos en reactores y el manejo y puesta en marcha de diferentes tipos de reactores en cultivo continuo.

El manual incluye ocho prácticas que tocan temas diversos de la ingeniería bioquímica. En la primera práctica, se presentan algunas metodologías analíticas indispensables para el desarrollo de las siguientes prácticas. Las prácticas 2 a 4 tratan temas sobre ingeniería y cinética enzimática, las prácticas 5 y 6, utilizando reactores con escala de laboratorio, se ejemplifican temas sobre transferencia de momento y de masa, como la agitación de fluidos, el consumo de potencia y la transferencia de oxígeno bajo diferentes condiciones de operación. En la práctica 7, utilizando un cultivo microbiano en un reactor en lote, se aplican los conocimientos de microbiología industrial así como de operación y control de reactores. Finalmente, la práctica 8 corresponde a la puesta en marcha y al manejo de diferentes tipos de reactores en cultivo continuo para la determinación de la distribución de tiempos de residencia.

Los profesores que imparten esta UEA tienen como cometido compartir con los alumnos la experiencia que han adquirido a lo largo de su trayectoria como docentes e investigadores.

Reglas de laboratorio¹

1. Alumnos y profesor deberán usar una bata de algodón bien abotonada, la que deberá quitarse antes de abandonar el laboratorio. No usar calzado descubierto y llevar el pelo recogido.
2. Evitar la acumulación de objetos no relacionados con la práctica sobre la mesa de trabajo.
3. Se prohíbe beber, comer, fumar y aplicarse cosméticos dentro del laboratorio.
4. Se deberá lavar meticulosamente las manos con jabón y agua antes de salir del laboratorio, incluso cuando salga por breves periodos.
5. No deberá pipetear oralmente ningún tipo de solución o cultivo microbiano, deberá realizarse con pipetas adecuadas para este fin.
6. No se admitirán visitas personales ni el uso de aparatos que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el trabajo.
7. Trabajar de manera ordenada y en silencio para evitar accidentes.

Procedimientos de laboratorio

1. Antes y después de cada sesión práctica los alumnos deberán limpiar las mesas de trabajo.
2. Localizar extintores, botiquín y salidas de emergencia.
3. Cuando se utilice el mechero, este deberá colocarse alejado del microscopio y otros equipos así como de sus cuadernos o prendas de vestir.
4. Al concluir cada sesión el alumno deberá asegurarse de que los materiales de desecho u objetos contaminados sean colocados en recipientes específicos para ello, colocados en lugares apropiados, que les indicará el profesor.
5. Siempre deberá dejar perfectamente limpios todos los equipos utilizados (balanzas analíticas, potenciómetros, espectrofotómetros, etc.) y reportar al maestro cualquier irregularidad en el funcionamiento.
6. Cuando se rompa material de vidrio, entregarlo a los laboratoristas, no tirarlo en el bote de basura.

Materiales indispensables en cada sesión de laboratorio

1. El manual de laboratorio
2. Un pedazo de tela sin pelusa, cerillos, tijeras, cinta de enmarcar (masking-tape), marcador indeleble o etiquetas pequeñas, jabón para manos.

¹ Instructivo de funcionamiento interno y operativo para regular el uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de Docencia. Aprobado por el Consejo Académico el 9 de noviembre del 2009.

Práctica 1

Determinación de azúcares reductores y proteínas solubles

Objetivo

Que el alumno conozca la técnica para la determinación cuantitativa de azúcares reductores y proteína soluble por método colorimétrico y lo aplique para conocer la concentración de cada una de ellas en una muestra.

Introducción

En el campo de la investigación biotecnológica, es necesario contar con métodos analíticos que permitan cuantificar componentes de las células, o bien, productos propios de las actividades celulares. Entre las determinaciones más usadas, se encuentran la cuantificación de proteínas y de carbohidratos, dos de los componentes más abundantes en los organismos vivos. El carbohidrato más común es la glucosa ($C_6H_{12}O_6$), un monosacárido que se comporta como azúcar reductor debido a que posee un grupo aldehído o puede formar uno en solución. Este grupo funcional le permite al azúcar actuar como un agente reductor, y es justamente esta propiedad, lo que permite cuantificar este tipo de azúcares mediante el uso del ácido dinitrosalicílico (DNS), un compuesto aromático que reacciona con los azúcares reductores formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico que absorbe luz a 575 nm.

Por otra parte, estimar el contenido de proteínas es necesario no solo en los laboratorios de investigación, sino también en las industrias alimentaria, farmacéutica y biotecnológica. Existen muchos métodos para la determinación de proteínas, y para elegir uno adecuado, es importante considerar los siguientes criterios: (i) la concentración de proteínas en la muestra; (ii) la necesidad de conservar la muestra; (iii) la presencia de compuestos que interfieran; (iv) la especificidad del método, y (v) la facilidad y reproducibilidad del método. La proteína soluble puede cuantificarse por el método de Lowry o por el método de Bradford. El primer método se basa en la reacción de los enlaces peptídicos con Cu^{+2} , bajo condiciones alcalinas, lo que reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu y genera compuestos de color azul que absorben luz a 750 nm. El método de Bradford implica la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a las proteínas, provocando un cambio en la absorción máxima de 465 nm (naranja) a 595 nm (azul).

Material

Material	Reactivos
45 tubos de ensaye con tapón de rosca	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
2 matraces aforados de 100 mL	Hidróxido de sodio
5 matraces aforados de 250 mL	Sulfito de sodio anhidro
2 vasos de precipitados de 500 mL	Fenol
5 vasos de precipitados de 100 mL	Sulfato de cobre
1 matraz aforado de 1000 mL	Tartrato doble de sodio y potasio
1 probeta de 50 mL	Carbonato de sodio
4 pipetas de 1 mL	Reactivo Folin-Ciocalteu
2 pipetas de 5 mL	Glucosa o dextrosa
2 pipetas de 10 mL	Reactivo de Bradford
1 frasco ámbar de 1 L	Albúmina de huevo o invertasa
2 gradillas	Agua destilada
1 micropipeta de 10-20 μ L	
1 micropipeta de 100-200 μ L	
1 micropipeta de 1000 μ L	
2 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	
2 celdas de vidrio para espectrofotómetro	
Papel seda	
Piseta con agua destilada	
Puntas azules y amarillas para micropipetas	
	Equipo
	Parrilla de calentamiento
	Baño María
	Agitador magnético
	Vórtex
	Espectrofotómetro

Procedimiento

I. Azúcares reductores

1. Preparar 100 mL de una solución patrón de glucosa con una concentración de 1.0 g/L.
2. Con la solución anterior, preparar por duplicado la siguiente curva patrón (Tabla 1).

Tabla 1. Elaboración de la curva patrón de azúcares reductores

Tubo	Volumen de la solución patrón (mL)	Volumen de agua (mL)	Concentración de glucosa (mg/L)
1	0.0	1.0	0
2	0.1	0.9	100
3	0.2	0.8	200
4	0.3	0.7	300
5	0.4	0.6	400
6	0.5	0.5	500
7	0.6	0.4	600
8	0.7	0.3	700
9	0.8	0.2	800
10	0.9	0.1	900
11	1.0	0.0	1000

3. Agregar 1 mL del reactivo DNS (ver Anexo I) a cada tubo y agitar.
4. Calentar en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos.
5. Enfriar en agua corriente o en un baño de hielo.
6. Agregar 8 mL de agua destilada a cada tubo y agitar.
7. Leer la densidad óptica (DO) en cada tubo a 575 nm, con el espectrofotómetro previamente calibrado con el blanco (tubo 1).

La muestra problema a analizar (1 mL), se somete al mismo tratamiento que la curva patrón. Si la lectura de DO es mayor que el valor máximo de la curva patrón, se debe repetir la determinación haciendo una dilución de la muestra.

II. Proteína soluble: método de Lowry

1. Preparar 100 mL de solución patrón de albúmina de huevo o invertasa (300 mg/L).
2. Preparar por duplicado la siguiente curva patrón (Tabla 2).

Tabla 2. Elaboración de la curva patrón de proteína soluble

Tubo	Volumen de la solución patrón (mL)	Volumen de agua (mL)	Concentración de albúmina (mg/L)
1	0.00	1.00	0.0
2	0.15	0.85	45
3	0.20	0.80	60
4	0.30	0.70	90
5	0.50	0.50	150
6	0.75	0.25	225
7	1.00	0	300

3. Adicionar a cada tubo 0.1 mL de NaOH 10 N y agitar
4. Poner a ebullición los tubos cerrados durante 20 minutos. Dejar enfriar.
5. Adicionar a cada tubo 5 mL de la solución D (Anexo I) y agitar vigorosamente
6. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos.
7. Adicionar a cada tubo 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Agitar vigorosamente.
8. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos.
9. Leer la DO a 750 nm con el espectrofotómetro previamente calibrado con el blanco (tubo 1).
10. La muestra problema a analizar (1 mL), se somete al mismo tratamiento que la curva patrón. Si el valor de la DO es mayor que el máximo de la curva patrón, debe repetirse la determinación haciendo una dilución de la muestra.

III. Proteína soluble: método de Bradford

1. Preparar 100 mL de solución patrón de albúmina de huevo (100 mg/L).
2. Preparar por triplicado la siguiente curva patrón (Tabla 3).

Tabla 3. Elaboración de la curva patrón de proteína soluble

Tubo	Volumen de la solución patrón (µL)	Volumen de agua (µL)	Concentración de albúmina (mg/L)
1	0	800	0
2	20	780	2
3	40	760	4
4	60	740	6
5	80	720	8
6	100	700	10
7	120	680	12
8	140	660	14
9	160	640	16
10	180	620	18
11	200	600	20

3. Adicionar a cada uno de los tubos 0.2 mL del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 500-0006).
4. Homogenizar la mezcla con ayuda de un vórtex.
5. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Leer la DO a 595 nm, con el espectrofotómetro previamente calibrado con el blanco (tubo1).
7. La muestra problema a analizar (0.8 mL), se somete al mismo tratamiento que la curva patrón. Si el valor de la DO supera el valor más alto de la curva patrón, debe repetirse la determinación haciendo una dilución de la muestra.

Resultados y discusión

- Elabore una gráfica de absorbancia contra concentración a partir de los resultados obtenidos para azúcares reductores y para proteína.
- Obtenga las ecuaciones correspondientes para cada recta y sus coeficientes de correlación.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el fundamento de la determinación de azúcares reductores por el método de DNS? ¿Cuál es la reacción que se lleva a cabo entre los reactivos y el azúcar reductor?
2. Explique en qué consiste la ley de Lambert y Beer y por qué se debe leer la densidad óptica en un intervalo de absorbancia menor a 1.
3. ¿Cuáles son los fundamentos de los métodos de Lowry y de Bradford para la determinación de proteínas? ¿Cuál es la reacción que se lleva a cabo entre los reactivos y las proteínas en ambos métodos?
4. Diga cuáles son las limitantes de las técnicas de Lowry y de Bradford y qué compuestos químicos interfieren con ellas.

Referencias bibliográficas

- Albertini A.V.P., Cadena P.G., Silva J.L., Nascimento G.A., Reis A.L.S., Freire V.N., Santos R.P., Martins J.L., Cavada B.S., Rolim Neto P.J., Pimentel M.C.B, Martínez C.R., Porto A.L.F., Lima Filho J.L. 2012. Performance of invertase immobilized on glass-ceramic support in batch bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 187: 341-350.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lucarini A.C., Kilikian B.V. 1999. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnology Techniques*, 13: 149-154.
- Miller G.L. 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Morrison R.T., Boyd R.N. 2010. Química Orgánica. *Fondo Educativo Interamericano*. México, 1423 pp.

Práctica 2

Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad enzimática

Objetivo

Que el alumno evalúe el efecto de la temperatura sobre la estabilidad y la actividad enzimática de la invertasa.

Introducción

Dentro de un límite de valores, la velocidad de una reacción enzimática aumenta cuando se eleva la temperatura. Esto es, hay una temperatura óptima en la cual la reacción es más rápida. El aumento en la velocidad de reacción es debido al incremento en la energía cinética de las moléculas reaccionantes, así como al incremento en la energía vibracional. Debido a esto, en estructuras bioquímicamente activas como las enzimas, las temperaturas extremas tanto bajas como altas afectan la actividad enzimática. A bajas temperaturas las reacciones serán muy lentas debido a la falta de energía cinética de las moléculas (sustrato). En el caso de temperaturas extremadamente altas, el exceso de energía vibracional ocasiona la ruptura de enlaces secundarios, con lo cual, la conformación espacial del sitio activo de la enzima puede perderse.

Material

Material	Reactivos
25 tubos de ensaye con tapón de rosca	Cloruro de sodio grado industrial
2 pipetas de 1 mL	Reactivo Folin-Ciocalteu
2 pipetas de 5 mL	Invertasa (Sigma,I4504)
1 matraz Erlenmeyer de 250 mL	Sacarosa
2 pipetas de 10 mL	Acetato de sodio
1 termómetro de 0 a 100 °C.	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
1 matraz aforado de 50 mL	Agua destilada
3 vasos de precipitados de 100 mL	Hielo
1 micropipeta de 200 µL	
1 micropipeta de 10-20 µL	
1 micropipeta de 1000 µL	
1 probeta de 250 mL	
1 agitador magnético	
Piseta con agua destilada	
2 gradillas	
2 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	
2 celdas de vidrio para espectrofotómetro	
Puntas azules y amarillas para micropipetas	
Papel seda	

Equipo
Baño de temperatura controlada
Vórtex
Parrilla de calentamiento
Baño María
Espectrofotómetro

Procedimiento

1. Preparar las siguientes soluciones (Anexo I)
 - Sacarosa (6.5 g/L) en una solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 4.6).
 - Invertasa (0.1 g/L) en una solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 4.6).
2. El procedimiento de la práctica se divide en dos partes: (I) determinación de la estabilidad enzimática a 50°C y (II) determinación de la actividad de la enzima a 20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C.

I. Estabilidad enzimática

Preparar baños a la temperatura indicada para todo el grupo. Para cada temperatura, incubar por duplicado 1 mL de la solución de enzima en tubos de ensaye durante 15 min. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación. Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento térmico, trasladar los tubos con enzima al baño de temperatura de 50°C y preincubarlos por 5 minutos más.

1. Preincubar a 50°C durante 5 minutos, 5 tubos conteniendo 5 mL de la solución de sacarosa a pH 4.6. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
2. Una vez que todos los tubos estén a 50°C, agregar a las soluciones de enzima los 5 mL de la solución de sacarosa, agitar y mantener en el baño a 50°C durante 15 min. Al cabo de este tiempo, colocar los tubos en hielo para detener la reacción.
3. Determinar azúcares reductores con DNS haciendo las diluciones convenientes.
4. Tomar una alícuota de la solución de enzima y determinar la concentración de proteína. Referirse en ambos casos a la curva patrón correspondiente.

II. Actividad enzimática

Preparar baños a las temperaturas indicadas. Para cada temperatura, incubar por duplicado 1 mL de la solución de enzima en tubos de ensaye durante 15 min. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.

1. Incubar a cada temperatura (20, 30, 40, 50, 60 y 70°C), un tubo con 5 mL de solución de sacarosa a pH 4.6.
2. Una vez preincubada cada serie de tubos a la temperatura correspondiente, agregar a las soluciones de enzima 5 mL de la solución de sacarosa, agitar y mantener en el baño a la temperatura correspondiente durante 15 min. Al cabo de este tiempo, colocar los tubos en hielo para detener la reacción.
3. Hacer las diluciones adecuadas del medio de reacción y determinar azúcares reductores con DNS.
4. Tomar una alícuota de la solución de enzima y determinar la concentración de proteína. Ambos casos deberán referirse a la curva patrón correspondiente.

Resultados y discusión

- Presente los resultados obtenidos para la estabilidad y actividad enzimática en función de la temperatura de incubación en la Tabla 4. En la tabla 5 se presentan los resultados de proteína.
- Para ambos casos (estabilidad y actividad), calcule la velocidad específica de hidrólisis de la enzima, calcule el porcentaje de consumo de sustrato para cada temperatura y repórtelos en la Tabla 6. Compare los valores obtenidos con los reportados en la literatura para esta enzima. Si no son iguales, explique cuál puede ser el motivo.
- Elabore una gráfica de actividad enzimática con respecto a la temperatura. Indique las diferencias entre estas dos gráficas y el significado de cada una de ellas. Si son iguales explique por qué. Señale la temperatura óptima encontrada para actividad y estabilidad y compárelo con lo reportado en la literatura.
- Obtenga los valores de Q_{10} para la reacción a las temperaturas utilizadas y la energía de activación (E_a) para la conversión de sustrato a producto de esta enzima. Compare estos valores y explique a qué se deben las diferencias.

Tabla 4. Producción de azúcares reductores en función de la temperatura.

	Temperatura (°C)												
	20		30		40		50		60		70		
	DO ₁	DO ₂	DO ₁	DO ₂	DO ₁	DO ₂	DO ₁	DO ₂	DO ₁	DO ₂	DO ₁	DO ₂	
DO													
Promedio													
Azúcares reductores (mg/L)													
Dilución (FD)													
Azúcares reductores (mg/L)													
Azúcares producidos (mmol/L)													
Sacarosa hidrolizada (mmol/L)													

Tabla 5. Contenido de proteína soluble en la solución de invertasa.

	DO (nm)	Promedio	Dilución	Concentración (mg/L)
DO ₁				
DO ₂				

Tabla 6. Actividad específica de la invertasa y sustrato consumido en función de la temperatura de reacción.

	Temperatura (°C)					
	20	30	40	50	60	70
Actividad específica <u>mmol sacarosa hidrolizada</u> mg proteína * minuto						
Sustrato consumido (%)						

Cuestionario

1. ¿Cómo se expresa matemáticamente la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción?
2. ¿Qué es el Q_{10} y qué significado tiene?
3. ¿Qué reacción cataliza la invertasa y para qué se utiliza industrialmente? ¿A qué temperatura es estable, a qué temperatura se desnaturaliza y a qué temperatura pierde su actividad?
4. ¿Qué es una enzima termoestable?

Referencias bibliográficas

- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. (Eds.) 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 273 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Karkas T., Onal S. 2012. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)/ magnesium sulfate aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 60: 142-150.
- Katoh S., Yoshida F. 2009. Biochemical Engineering: A textbook for Engineers, chemists and biologists. *Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co.* Germany. 260 pp.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Miller G.L. 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Segel I.H. 1993. Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *Wiley Interscience Publications*, 945 pp.
- Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology - Techniques in Pure and Applied Microbiology. Göran-Heden C. (Ed.) *John Wiley & Sons*. NY USA, 422 pp.

Práctica 3

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad enzimática

Objetivo

Que el alumno evalúe el efecto del pH sobre la estabilidad de la invertasa y determine el pH óptimo para su actividad enzimática.

Introducción

Las enzimas son proteínas que, generalmente, mantienen su estructura terciaria y cuaternaria mediante puentes de hidrógeno, enlaces sulfhidrilo (-S-S-) y otras interacciones electrónicas. La presencia de H^+ u OH^- puede modificar el arreglo espacial de la estructura terciaria o cuaternaria, afectando por lo tanto la estructura espacial del sitio activo, lo que determinará la capacidad de reacción de la enzima con el sustrato. Asimismo, los cambios de pH afectan de manera directa el estado iónico de la enzima y por tanto su actividad enzimática.

Material

Material	Reactivos
30 tubos de ensaye con tapón de rosca	Cloruro de sodio grado industrial
2 pipetas de 1 mL	Estándar de calibración, pH 4 y pH 7
2 pipetas de 5 mL	Reactivo Folin-Ciocalteu
1 micropipeta de 200 μ L	Reactivo de Bradford
1 micropipeta de 1000 μ L	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
1 pipeta de 10 mL	Albúmina de huevo o invertasa
2 gradillas	Dextrosa
1 termómetro de 0 a 100 °C	
1 probeta de 50 mL	
1 matraz aforado de 100 mL	
4 vasos de precipitados de 100 mL	
1 vaso de precipitados de 50 mL	
2 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	
Papel seda	
Puntas azules y amarillas para micropipetas	
Piseta con agua destilada	
2 celdas de vidrio para espectrofotómetro	

Procedimiento

1. Preparar previamente soluciones amortiguadoras de acetatos (0.1 M) a pH 3.6, 4.0, 4.6, 5.2 y 5.6 (ver Anexo I).
2. Preparar 100 mL de soluciones de sacarosa (6.5 g/L) en las soluciones amortiguadoras a diferente pH.
3. Preparar 50 mL de solución de invertasa (0.1 g/L) en las soluciones amortiguadoras a distinto pH.
4. El procedimiento de la práctica se divide en dos partes: (I) determinación de la estabilidad enzimática y (II) determinación de la actividad enzimática. Ambos procedimientos se realizarán a valores de pH de 3.6, 4.0, 4.6, 5.2 y 5.6.

I. Estabilidad enzimática

1. Tomar por duplicado 1 mL de las soluciones de enzima con diferentes valores de pH y colocar en tubos de ensaye. Incubar en un baño a 50°C durante 5 minutos. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
2. Colocar en 5 tubos de ensaye 5 mL de la solución de sacarosa a pH 4.6 y preincubar durante 5 minutos. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
3. Una vez que los tubos estén a 50°C, agregar a las soluciones de enzima con diferentes valores de pH, 5 mL de la solución de sacarosa agitar y mantener a 50°C por 15 minutos más.
4. Determinar azúcares reductores con DNS, haciendo las diluciones convenientes.
5. Tomar una alícuota de la solución de enzima y determinar la concentración de proteína. Referirse en ambos casos a la curva patrón correspondiente.

II. Actividad enzimática

1. Tomar por duplicado 1 mL de las soluciones de enzima con diferentes valores de pH y colocarlos en tubos de ensaye. Preincubar en el baño a 50°C durante 5 minutos. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
2. Al mismo tiempo, preincubar 5 minutos a 50°C, 5 tubos con 10 mL de solución de sacarosa con diferentes valores de pH. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
3. Después de 5 minutos, agregar a las soluciones enzimáticas 5 mL de la solución de sacarosa agitar a los valores correspondientes de pH y mantener en el baño a 50°C durante 15 minutos. Colocar los tubos en hielo para detener la reacción.
4. Determinar azúcares reductores con DNS, haciendo las diluciones convenientes.
5. Tomar una alícuota de la solución de enzima y determinar la concentración de proteína. Las determinaciones deberán referirse a la curva patrón correspondiente.

Resultados y discusión

- Presente los resultados obtenidos para la estabilidad y actividad enzimática en función del pH en la Tabla 7 y proteína en la tabla 8.
- Para ambos casos (estabilidad y actividad), calcule la velocidad específica de hidrólisis de la enzima, y calcule el porcentaje de consumo de sustrato para cada pH y preséntelos en la Tabla 9.
- Elabore una gráfica de estabilidad y actividad enzimática con respecto al pH. Indique las diferencias que encuentra en estas dos gráficas y el significado de cada una de ellas.
- Reporte la actividad que obtuvo para cada pH y compárelo con la actividad y el pH reportado en la literatura para esta enzima.
- Discuta el efecto del pH sobre la estabilidad estructural y actividad específica de la enzima. Explique la influencia a nivel molecular de este parámetro. Explique la relación que existe entre el grado de ionización del sustrato y de la enzima en el momento de la reacción.

Tabla 7. Producción de azúcares reductores en función del pH.

	pH									
	3.6		4.0		4.6		5.2		5.6	
	DO ₁	DO ₂								
DO										
Promedio										
Azúcares reductores (mg/L)										
Dilución (FD)										
Azúcares reductores (mg/L)										
Azúcares producidos (mmol/L)										
Sacarosa hidrolizada (mmol/L)										

Tabla 8. Contenido de proteína soluble en la solución de invertasa

	DO (nm)	Promedio	Dilución	Concentración (mg/L)
DO ₁				
DO ₂				

Tabla 9. Actividad específica de la invertasa y sustrato consumido en función del pH

	pH				
	3.6	4.0	4.6	5.2	5.6
Actividad específica <u>mmol sacarosa hidrolizada</u> mg proteína * minuto					
Sustrato consumido (%)					

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las principales características de la invertasa con respecto al pH?
2. ¿Qué influencia tiene a nivel molecular el pH y la fuerza iónica del medio sobre las enzimas, sobre la conformación del sitio activo y sobre su actividad?
3. ¿A qué pH es estable la invertasa, a cuál se desnaturaliza y a cuál pierde su actividad?
4. ¿Cómo se define pH y pK_a ?
5. ¿Qué es el pH óptimo de una enzima?

Referencias bibliográficas

- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. (Eds.) 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 273 pp.
- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2ª Ed. *Academic Press Inc.* London, 434 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Katoh S., Yoshida F. 2009. Biochemical Engineering: A textbook for Engineers, chemists and biologists. *Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co.* Germany, 260 pp.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Miller G.L. 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Segel I.H. 1993. Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *Wiley Interscience Publications*, 945 pp.
- Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology - Techniques in Pure and Applied Microbiology. Göran-Heden C. (Ed.) *John Wiley & Sons.* NY USA, 422 pp.

Práctica 4

Determinación de los parámetros cinéticos de la invertasa

Objetivo

Que el alumno aprenda la metodología para la determinación de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la invertasa, determinando la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato.

Introducción

El uso cotidiano de las enzimas, ya sea a nivel industrial o laboratorio, requiere conocer la cantidad de enzima o de extracto enzimático a utilizar para una transformación enzimática específica. La actividad catalítica de una enzima permite medir la cantidad de enzima presente. Esto es, para medir la cantidad de una enzima en una muestra de extracto celular o de un líquido biológico, se mide la velocidad de la reacción catalizada por ella. En condiciones adecuadas, la velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente.

La velocidad de hidrólisis enzimática se expresa en Unidades Enzimáticas. Para el caso de la invertasa, las Unidades Internacionales de Invertasa (UII), están definidas como la concentración de sacarosa transformada por minuto:

$$UII = \frac{\mu\text{mol de sustrato transformado}}{\text{minuto}}$$

La velocidad de hidrólisis de esta enzima también se puede expresar en Unidades Internacionales Específicas de Invertasa (UIEI), que equivale a la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una micromol de sustrato por minuto, y por mg de proteína.

$$UIEI = \frac{\mu\text{mol de sustrato transformado}}{\text{mg proteína} \times \text{minuto}} = \frac{UII}{\text{mg proteína}}$$

Los parámetros cinéticos de una enzima están definidos en la ecuación de Michaelis-Menten como la velocidad máxima de reacción (V_{max}), expresada en unidades de actividad enzimática, y su afinidad por el sustrato (K_m), expresada en unidades de concentración. La relación entre ambos parámetros es $K_m = \frac{1}{2} V_{max}$. La máxima velocidad de reacción para una concentración constante de enzima, se encontrará cuando la enzima esté saturada por el sustrato y la cinética esté descrita por una reacción de orden cero, es decir, cuando la velocidad de reacción sea independiente de la concentración de sustrato. Alrededor del valor de K_m se encontrarán reacciones de primer orden, en donde la velocidad de reacción dependerá de la concentración de sustrato en una proporción directa.

Material

Material	Reactivos
50 tubos de ensaye con tapón de rosca	Cloruro de sodio grado industrial
2 pipetas de 1 mL	Reactivo Folin-Ciocalteu
2 pipetas de 5 mL	Reactivo de Bradford
1 pipeta de 10 mL	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
2 gradillas	Albúmina de huevo o invertasa
1 termómetro de 0 a 100 °C	Agua destilada
1 probeta de 50 mL	Ácido acético
3 vasos de precipitados de 100 mL	Acetato de sodio
2 vasos de precipitados de 500 mL	Sacarosa
1 micropipeta de 200 µL	
1 micropipeta de 1000 µL	
Agitador magnético	
2 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	
Puntas azules y amarillas para micropipetas	
2 celdas de vidrio para espectrofotómetro	
Papel seda	
Piseta con agua destilada	
1 matraz aforado de 100ml	
1 matraz aforado de 500 ml	
	Equipo
	Vórtex
	Parrilla de calentamiento
	Baño María
	Espectrofotómetro
	Baño de temperatura controlada

Procedimiento

1. Preparar 500 mL de solución amortiguadora de acetatos 0.1 M (pH 4.6) (Anexo I)
2. Preparar 100 mL de solución enzimática de invertasa (0.1 g/L) en la solución amortiguadora de acetatos.
3. Preparar soluciones de sacarosa, en amortiguador de acetatos, con las siguientes concentraciones (g/L): 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80.

Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la invertasa se llevará a cabo mediante el procedimiento que se describe a continuación.

1. Incubar 10 mL de la solución de enzima en 5 tubos de ensaye durante 5 minutos a 50 °C. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
2. Incubar por duplicado, en tubos de ensayo, 5 mL de cada concentración de sacarosa durante 5 minutos a 50 °C. Los tubos deberán taparse para evitar evaporación.
3. Después de preincubar los tubos, agregar a las soluciones de sacarosa 1 mL de solución de enzima, agitar y mantener a 50°C por 15 min. Colocar los tubos en hielo para detener la reacción.

4. Hacer las diluciones adecuadas en el medio de reacción y determinar azúcares reductores con DNS.
6. Tomar una alícuota de la solución de enzima y determinar la concentración de proteína.
7. Ambos casos deberán referirse a la curva patrón correspondiente.

Resultados y discusión

- Completar las Tablas 10, 11 y 12 con los resultados obtenidos.
- Elaborar una gráfica de la actividad enzimática *versus* la concentración de sustrato. A partir de estos datos, calcular la V_{max} y el K_m por tres métodos diferentes.
- Discutir acerca de la diferencia de los valores de las constantes al ser calculadas por los diferentes métodos. ¿Cuál método cree que es mejor? ¿Por qué?
- Compare los valores obtenidos con los reportados en la literatura para esta enzima y discuta acerca de si son cercanos o no. Con base en lo anterior, discuta acerca de si considera satisfactorio el resultado obtenido y ¿Por qué?

Tabla 10. Producción de azúcares reductores en función de la concentración de sacarosa.

Sacarosa (g/L)		DO (nm)		Promedio (nm)	Dilución	Az. reduc. (mg/L)	Az. reduc. (mmol/L)	Sacarosa hidrolizada (mmol/L)
		DO ₁	DO ₂					
S ₁	1							
S ₂	5							
S ₃	10							
S ₄	20							
S ₅	30							
S ₆	40							
S ₇	50							
S ₈	60							
S ₉	70							
S ₁₀	80							

Tabla 11. Contenido de proteína soluble en la solución de invertasa

	DO (nm)	Promedio	Dilución	Concentración (mg/L)
DO ₁				
DO ₂				

Tabla 12. Actividad específica y volumétrica de la invertasa a diferentes concentraciones de sacarosa

	Concentración de sustrato (mmol/L)									
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Vel. hidrólisis (UIE) mmol sacarosa hidrolizada mg proteína * minuto										
Vel. hidrólisis (UII) mmol sacarosa hidrolizada L * minuto										
Sustrato consumido (%)										

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de determinar K_m y V_{max} para una enzima?
2. ¿Cuál es la ventaja de expresar la velocidad en forma específica (UIE)?
3. Explique cómo es la afinidad de la enzima por el sustrato si el valor de K_m es pequeño. Fundamente su respuesta.
4. ¿Qué es K_m y cuál es su significado?
5. Explique cómo se determina la máxima velocidad de una reacción enzimática.

Referencias bibliográficas

- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. (Eds.) 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 273 pp.
- Albertini A.V.P., Cadena P.G., Silva J.L., Nascimento G.A., Reis A.L.S., Freire V.N., Santos R.P., Martins J.L., Cavada B.S., Rolim Neto P.J., Pimentel M.C.B, Martínez C.R., Porto A.L.F., Lima Filho J.L. 2012. Performance of invertase immobilized on glass-ceramic support in batch bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 187: 341-350.
- Barredo J.L. 2005. Microbial Enzymes and Biotransformations. 1ª Ed. *Humana Press*. USA. 319 pp.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Miller G.L. 1959. The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Karkas T., Onal S. 2012. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)/ magnesium sulfate aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 60: 142-150.
- Kato H., Yoshida F. 2009. Biochemical Engineering: A textbook for Engineers, chemists and biologists. *Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co.* Germany, 260 pp.
- Raj L., Chauban G.S., Azmi W., Ahn J.H., Manuel J. 2011. Kinetics study on invertase covalently linked to a new functional nanogel. *Bioresource Technology*, 102: 2177-2184.
- Segel I.H. 1993. Enzyme Kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *Wiley Interscience Publications*, 945 pp.
- Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology - Techniques in Pure and Applied Microbiology. Göran-Heden C. (Ed.) *John Wiley & Sons*. NY USA, 422 pp.

Práctica 5

Determinación de la potencia necesaria para la agitación de fluidos newtonianos y no newtonianos en reactores con y sin aireación

Objetivos

1. Identificar si un fluido es newtoniano o no newtoniano.
2. Determinar el efecto sobre el consumo de potencia de diferentes factores como: tipo de fluido (newtoniano y no newtoniano), propiedades del fluido (viscosidad y densidad), geometría del reactor (tipo y número de impulsor, presencia y ausencia de mamparas), velocidad de agitación y flujo de aireación.
3. Obtener y comparar los valores experimentales de potencia sin aireación (P_{E0}) y con aireación (P_{Eg}) con los valores de potencia teóricos para reactores sin aireación (mediante el uso de correlaciones entre el N_{Re} y el N_p) y para reactores con aireación (mediante las correlaciones entre la relación P_g/P_0 y el N_a).

Introducción

En los reactores biológicos, la agitación juega un papel determinante en el proceso. Su principal función es mantener a los microorganismos en suspensión, además de brindar una buena homogeneización del medio de cultivo. También permite proveer a los microorganismos del oxígeno necesario para su metabolismo. Por lo general, la agitación se realiza mediante dispositivos mecánicos que implican cierto consumo de potencia. Durante la fermentación, el crecimiento microbiano provoca cambios en la composición del medio de cultivo y en su viscosidad. En consecuencia, se presenta una variación en la potencia requerida para agitar el sistema. El aumento en la potencia se relaciona directamente con la cantidad de energía requerida para la agitación, haciendo de este factor un costo de operación adicional.

Generalmente, la potencia requerida o consumida por un sistema se determina mediante el uso de correlaciones entre números adimensionales, como el número de Reynolds (N_{Re}) y el número de potencia (N_p). La forma de calcular estos números adimensionales depende de si el fluido es o no newtoniano. El cálculo del número de potencia para fluidos newtonianos y no newtonianos es importante también en el escalamiento de los bioprocesos.

La aireación tiene un efecto importante sobre el consumo de potencia en un sistema. Cuando se introduce aire a un medio líquido previamente agitado, se presenta una reducción inmediata en los requerimientos de potencia para su agitación. Esta disminución dependerá principalmente del tipo de impulsor empleado y de la cantidad de aire introducida al sistema.

El consumo de potencia con fluidos newtonianos, bajo condiciones aireadas, se puede calcular mediante el uso de correlaciones entre números adimensionales, como el número de potencia (N_p), la relación P_g/P_0 (donde P_g es la potencia absorbida por el sistema aireado y P_0 la potencia absorbida por el sistema sin aireación) y el número de aireación (N_a). También se pueden utilizar correlaciones como la de Mitchel y Miller para estimar el consumo de potencia con fluidos no newtonianos en sistemas aireados.

Material

Material	Reactivos
1 vaso de precipitados de 2 L	Sacarosa grado industrial
1 espátula	Cloruro de sodio grado industrial
1 vaso de precipitados de 600 mL	Carboximetilcelulosa
1 vaso de precipitados de 50 mL	2 sobres de almidón en polvo
1 pipeta de 1 mL	Agua destilada
1 probeta de 1 L	
1 embudo grande	
1 matraz Erlenmeyer de 2 L	
Papel seda	
Piseta de agua destilada	
	Equipo
	Reactor con medidor de corriente y voltaje
	Viscosímetro
	Agitador magnético
	Parrilla de agitación

Procedimiento²

I. Preparación de fluidos

1. Preparar 2 L de las siguientes soluciones (una solución por equipo):
 - a. Cloruro de sodio en concentraciones de 150 g/L y 300 g/L
 - b. Sacarosa en concentración de 600 g/L
 - c. Carboximetilcelulosa en concentraciones de 2 g/L y de 6 g/L
 - d. Solución de almidón en polvo para preparar atole, según las instrucciones del sobre.
2. Determinar a cada fluido:
 - a. La viscosidad mediante el viscosímetro según las especificaciones del equipo.
 - b. La densidad mediante el peso de una cantidad determinada de solución.

II. Caracterización de los reactores

Medir con precisión las dimensiones de los reactores: diámetro del reactor, número, ancho y largo de mamparas, diámetro del impulsor, tipo de impulsor, número, ancho y altura de las paletas del impulsor.

² **NOTA para el profesor.** Se sugiere que cada equipo trabaje con un fluido en particular y que en el reporte se integren los datos obtenidos para todos los fluidos trabajados. Para el mejor desarrollo de la práctica, se sugiere que las soluciones se preparen con anterioridad.

III. Consumo de potencia

Determinar experimentalmente el consumo de potencia de la siguiente manera.

Caso A. Agitación sin aireación. En cada reactor, se trabajará para cada fluido, diferentes velocidades de agitación de la siguiente forma:

- Adicionar al reactor de trabajo la solución a ensayar y comenzar la agitación a diferentes velocidades (50-700 rpm).
- Observar durante unos minutos el comportamiento del fluido con las diferentes velocidades de agitación.
- Registrar el amperaje (A) y voltaje (V) consumido en cada velocidad de agitación utilizada, con lo cual se calculará la potencia experimental sin airear (P_{E0}).

Caso B. Agitación con aireación. En cada reactor se trabajará para cada fluido, dos velocidades de agitación (200 y 600 rpm) y diferentes flujos de aireación (773 – 2469 mL/min):

- Adicionar al reactor la solución a ensayar y fijar la velocidad de agitación a 200 rpm.
- Manteniendo constante la velocidad de agitación, evaluar los diferentes flujos de aire a trabajar (Tabla 13). Registrar en cada caso el amperaje (A) y voltaje (V) consumido, con lo que se calculará la potencia experimental con aireación (P_{Ea}). Observar durante unos minutos el comportamiento del fluido a los diferentes flujos de aireación.
- Repetir el mismo procedimiento a una velocidad de agitación de 600 rpm.

Tabla 13. Escala correspondiente a los flujos a evaluar en el fluxómetro

Q (mL/min)	Escala	Amperaje (A)	Voltaje (V)
773	1		
996	5		
1480	10		
1982	15		
2469	20		

Resultados y discusión

- Elaborar un diagrama con las dimensiones de los reactores, impulsores y mamparas, así como el tipo y número de impulsores empleados. Reportar las relaciones geométricas de cada reactor en la Tabla 14.
- Reportar en la Tabla 15 las densidades y viscosidades de cada fluido trabajado.
- Comparar las viscosidades obtenidas en la práctica con las viscosidades de otros fluidos newtonianos y no newtonianos.
- Según los resultados experimentales para los fluidos trabajados, calcular y tabular para el **Caso A**:
 - La potencia experimental (P_E) consumida para cada velocidad de agitación, de la siguiente forma: $P_E = (A) (V)$

- b. El número de Reynolds (N_{Re})
 - c. El número de potencia experimental (N_{PE}) para cada velocidad de agitación.
 - d. Elaborar una gráfica de el número de potencia experimental (N_{PE}) contra el número de Reynolds.
5. Calcular mediante las correlaciones entre los números adimensionales reportadas en la literatura para fluidos newtonianos y no newtonianos:
 6. El número de potencia teórico (N_{PT}) para cada velocidad de agitación evaluada.
 - a. El consumo de potencia teórico (P_T), considerando los factores de corrección pertinentes para cada caso (P_{TR}).
 - b. Comparar el valor calculado de la potencia experimental contra el valor calculado de la potencia teórica y reportarlos en la Tabla 16.
 7. Según los resultados experimentales para todas las soluciones trabajadas, calcular y tabular para el **Caso B**:
 - a. El número de Reynolds (N_{Re})
 - b. La potencia experimental (P_{Eg}) consumida con aireación: $P_{Eg} = (A) (V)$. La potencia experimental sin aireación (P_{Eo}), también se calcula como $P_{Eo} = (A) (V)$.
 - c. El número de aireación para cada flujo de aire ensayado ($N_A = Q/NDim^3$)
 - d. Elaborar una gráfica con la relación P_{Eg}/P_{Eo} contra el número de aireación
 8. Mediante las correlaciones entre los números adimensionales reportadas en la literatura para fluidos newtonianos y no newtonianos, calcular el consumo de potencia teórica con aireación (P_{Tg}), considerando los factores de corrección pertinentes para cada caso (P_{TRg}).
 9. Comparar el valor calculado de la potencia experimental aireada contra el valor calculado de la potencia teórica aireada (Tabla 17).
 10. Discutir los resultados comparando con lo reportado en la literatura.

Tabla 14. Relaciones geométricas para cada reactor.

Tipo de impulsor	Dim/D	H/D	W/Dim	C/Dim	No. de baffles	J/D	L/D

Tabla 15. Viscosidad y densidad del fluido.

Viscosidad		Densidad		
Vel. de corte (rpm)*	μ (cP)	Peso (g)	Densidad (g/L)	Densidad promedio (g/L)
0.3				
2				
5				
12				
30				
60				

Tabla 16. Parámetros de agitación y potencia por fluido en cada reactor en un sistema sin aireación.

N (rpm)	A (A)	V (V)	P_E (W)	N_{PE}	N_{Re}	N_{PT}	P_T (W)	P_{TR} (W)
30								
60								
100								
200								
300								
500								
700								

* Los valores de velocidad de corte a experimentar depende del viscosímetro usado.

Tabla 17. Parámetros de agitación y potencia por fluido en cada reactor en un sistema con diferentes flujos de aireación.

Q = 0 (mL/min)							
N (rpm)	A (A)	V (V)	P_{Eg} o P_{EO} (W)	P_{Eg}/P_{EO}	N_A	P_{TRg} o P_{TRO} (W)	P_{TRg}/P_{TRO}
200							
600							
Q = [773-2469] (mL/min)							
N (rpm)	A (A)	V (V)	P_{Eg} o P_{EO} (W)	P_{Eg}/P_{EO}	N_A	P_{TRg} o P_{TRO} (W)	P_{TRg}/P_{TRO}
200							
600							

Cuestionario

1. Explique qué es un fluido newtoniano y qué es uno no newtoniano. Cite dos ejemplos para cada caso.
2. ¿Cuál es la relación entre N_p y N_{Re} en régimen: (a) turbulento y (b) laminar? ¿Cuál es la importancia de estos parámetros en el escalamiento de biorreactores?
3. Explique qué comportamiento puede presentar la viscosidad de los cultivos en lote. Cite dos ejemplos.
4. Explique a qué factores se puede atribuir la disminución en el consumo de potencia en un sistema cuando se introduce aireación.
5. Explique cuál es la relación entre la razón P_g/P_o y el número de aireación y cuál es la relación entre N_p y el número de aireación.

Referencias bibliográficas

- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. (Eds.) 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 273 pp.
- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2ª Ed. *Academic Press Inc.* London, 434 pp.
- Quintero R.R. 1993. Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones. Ed. *Alhambra Mexicana*. México, 322 pp.
- Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology - Techniques in Pure and Applied Microbiology. Göran-Heden C. (Ed.) *John Wiley & Sons*. NY USA, 422 pp.
- Welty J.R., Wilson R.E., Wicks C.E. 1979. Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer. 2ª Ed. *John Wiley and Sons*, 242 pp.

Práctica 6

Determinación del coeficiente convectivo de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y del coeficiente respiratorio de los microorganismos (QO_2)

Objetivo

Obtener experimentalmente los valores de coeficiente de transferencia de O_2 aparente ($k_L a$) en agua destilada, así como el $k_L a$ y el coeficiente respiratorio (QO_2) de un cultivo microbiano.

Introducción

Los organismos aerobios requieren oxígeno para el desarrollo de sus funciones vitales (crecimiento, reproducción, etc.) y para la obtención de energía. En el cultivo sumergido, el oxígeno disponible para los microorganismos se encuentra disuelto en el agua (o en el medio de cultivo). El buen desarrollo de los cultivos microbianos depende, entre otros factores, de la concentración de O_2 disuelto. El O_2 se disuelve por el contacto del aire con la superficie del agua, hasta alcanzar el punto de saturación, que depende de la temperatura y de la concentración de solutos disueltos en el agua. Así, a 0 °C, el punto de saturación de O_2 disuelto en agua pura es de 14.8 ppm. Esta concentración disminuye al aumentar la temperatura del agua, por ejemplo, a 15 °C la concentración de O_2 disuelto es de 10.4 ppm.

Existen dos aspectos importantes de considerar en los sistemas aireados. La demanda de O_2 por los microorganismos y la limitación que impone su transferencia desde las burbujas de gas hacia el líquido y posteriormente hacia los microorganismos. La magnitud del coeficiente de transferencia de O_2 ($k_L a$) y del coeficiente respiratorio (o demanda de oxígeno, QO_2), indicará las limitaciones del proceso y dará la pauta para resolver problemas de diseño y escalamiento de bioprocesos. Ambos coeficientes pueden determinarse mediante el método dinámico en pequeños intervalos de tiempo durante el estado transitorio en un fermentador, para lo cual se requiere registrar el cambio de concentración del O_2 disuelto (OD) con respecto al tiempo.

El coeficiente de transferencia de O_2 ($k_L a$), es una medida de la capacidad de transferencia de O_2 en un reactor e interviene directamente en su productividad. El valor de $k_L a$ depende de muchos factores, entre los cuales se pueden mencionar la capacidad de aireación, la operación y geometría del reactor, así como de la composición del medio de cultivo. El $k_L a$ se puede calcular en un sistema abiótico a partir de la ecuación de balance de O_2

$$dc/dt = (k_L a) (C_s^* - C_L) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

C_s^* es la concentración de O_2 disuelto en la saturación

C_L es la concentración de O_2 disuelto en el seno del líquido en un tiempo dado

La demanda de O_2 de los microorganismos para la respiración es un indicador de la actividad microbiana. Este coeficiente respiratorio puede ser calculado en un cultivo microbiano junto con el $k_L a$ mediante la siguiente ecuación de balance:

$$dC/dt = (k_L a) (C_s^* - C_L) - QO_2 X \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

dC/dt = cambio de concentración de oxígeno con el tiempo, mg O_2 /L h

$k_L a$ = coeficiente convectivo de transferencia de masa, t^{-1}

C_s^* es la concentración de O_2 disuelto en la saturación, mg/L

C_L es la concentración de O_2 disuelto en el seno del líquido en un tiempo dado, mg/L

QO_2 = coeficiente respiratorio, mg O_2 / g células h

X = biomasa, g/L

Material

Material	Reactivos
Parte A	Fluido: agua destilada
1 vaso de precipitados de 2 L	Cloruro de sodio
1 espátula	Equipo
Parte B	Reactor con medidor y electrodo de O_2 disuelto
1 vaso de precipitados de 2 L	Tanque de nitrógeno con regulador
1 espátula	Cultivo viable de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Papel filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/F (0.7 micras)	

Procedimiento

I. Calibración del electrodo de oxígeno

Previo al desarrollo de la práctica, se debe calibrar el electrodo de oxígeno disuelto (OD) con agua destilada. El procedimiento es el siguiente.

- Calibrar a cero el electrodo, para lo cual se deberá eliminar completamente el OD del agua. Esto se puede lograr mediante la adición de sulfito o a través del desplazamiento del oxígeno con una corriente de nitrógeno.
- Esperar a que el registrador de OD se estabilice en el valor más bajo.
- Una vez estable, ajustar en el registrador el cero electrónico. Esto se realiza con un desarmador.
- Ya calibrado el cero, se procede a calibrar el 100% de OD, para lo cual se airea el fluido. Se espera a que el registrador se estabilice en el valor máximo y se ajusta al 100% electrónico.

II. Determinación del $k_L a$ aparente

1. Para determinar el $k_L a$ aparente se realiza el siguiente procedimiento:
 - a. Llenar el reactor con 2 L de agua destilada.
 - b. Establecer una velocidad de agitación (100 – 700 rpm) y un flujo de aireación de trabajo (996 – 2469 mL/min).
 - c. A las condiciones de experimentación establecidas, registrar la concentración de OD mediante el electrodo, usando varios intervalos de tiempo durante al menos 2 min. Esta zona corresponderá a la Zona I.
 - d. Cortar el suministro de aire al reactor.
 - e. Eliminar el OD del agua por desplazamiento con una corriente de nitrógeno hasta alcanzar 0%. Registrar la concentración de OD a varios intervalos de tiempo hasta alcanzar el cero. Esta zona corresponderá a la Zona II.
 - f. Reanudar la agitación y suministrar nuevamente aire al fermentador y registrar la concentración de OD a varios intervalos de tiempo y hasta alcanzar al menos 90% de la saturación. Esta zona corresponderá a la Zona III.
 - g. Calcular el $k_L a$ [h^{-1}] mediante la gráfica logarítmica de la concentración de OD ($\ln(1-C_L/C^*)$) contra el tiempo (utilizar los datos obtenidos en la zona III), de manera que:

$$\ln(1-C_L/C^*) = -k_L a t$$

- h. Repetir los pasos (b) - (g) usando el mismo volumen de agua con otra velocidad de agitación y flujo de aire para los mismos tiempos.

III. Determinación dinámica del $k_L a$ y QO_2 de un cultivo microbiano

1. Preparar 2 L de medio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo I). Inocular el reactor con 1.0 g/L de levadura liofilizada. Se deberá cultivar durante 24 horas a 250 rpm, con un flujo de aireación de 1480 mL/min y 25°C.
2. Medir el $k_L a$ y QO_2 de la siguiente forma:
 - a. Establecer un flujo de aire (996 – 2469 mL/min) y una velocidad de agitación (100 – 700 rpm). En este momento se registra la concentración de OD en el reactor, la cual se mantendrá constante a varios intervalos de tiempo durante al menos 2 min (Zona I).
 - b. Suspender el flujo de aire y la agitación. Registrar la concentración de OD en el reactor con respecto al tiempo hasta alcanzar un valor cercano a la concentración crítica de oxígeno para este microorganismo. Es importante registrar estos datos en intervalos de tiempo no mayores a 10 segundos (Zona II).
 - c. Reanudar la aireación y la agitación hasta restablecer una concentración de OD similar a la inicial (Zona I). Registrar el aumento en intervalos de tiempo de 3 a 5 seg (Zona III).
 - d. Repetir los pasos (a) - (c) usando el mismo cultivo con otra velocidad de agitación y flujo de aire para los mismos tiempos.

IV. Determinación de biomasa

1. Poner a peso constante los filtros de microfibras de vidrio en una estufa a 70°C.
2. Dejar enfriar los filtros en un desecador y tomar su peso final.
3. Filtrar a vacío un volumen conocido (35 mL) de la muestra a través de los filtros a peso constante.
4. Meter los filtros con la biomasa a la estufa a 70°C durante 24 h.
5. Dejar enfriar en un desecador y determinar el peso seco de cada filtro con biomasa.
6. Calcular la concentración de biomasa (peso seco) para cada muestra, mediante la relación de pesos entre los filtros de microfibras de vidrio con y sin biomasa. Para calcular la concentración de biomasa, debe relacionarse el peso seco de la biomasa con el volumen de suspensión filtrado.

Resultados y discusión

- Presentar las figuras de C_L vs tiempo para cada condición de trabajo.
- Reportar en la Tabla 18 los valores de $k_L a$ aparentes.
- Presentar las figuras de C_L vs tiempo para cada condición de trabajo. Determinar el valor de $k_L a$ (utilizando los datos de la zona III) y QO_2 (utilizando los datos de la zona II), mediante el método dinámico y numérico. Presentar los datos en la Tabla 19.
- Comparar los valores de QO_2 obtenidos experimentalmente con los valores reportados en la literatura para levaduras y discutir las diferencias.
- Discutir los resultados comparando con lo reportado en la literatura.

Tabla 18. Valores de $k_L a$ aparentes a diferentes velocidades de agitación y flujos de aireación.

Vel. de agitación (rpm)	Reactor 1		Reactor 2	
	Flujo de aire (mL/min)			
	Q1 = 996	Q2 = 2469	Q1 = 996	Q2 = 2469
N1 = 100				
N2 = 400				
N3 = 700				

Tabla 19. Valores de $k_L a$ y QO_2 a diferentes velocidades de agitación y flujos de aireación.

Vel. de agitación (rpm)	Reactor 1		Reactor 2	
	Flujo de aire (mL/min)			
	Q1 = 1480	Q2 = 2469	Q1 = 1480	Q2 = 2469
N1 = 300				
N2 = 500				
N3 = 700				

Cuestionario

1. ¿Cómo se afecta el valor del $k_L a$ con respecto a la agitación?
2. ¿Cómo se puede aumentar el valor del $k_L a$ en un reactor?
3. ¿Qué métodos experimentales existen para determinar el $k_L a$ y QO_2 , cuál es su principio y cuáles son sus ventajas y desventajas?
4. Diga qué correlaciones teóricas se pueden utilizar para el cálculo del $k_L a$.
5. Si la cinética de consumo de oxígeno por los microorganismos siguiera una cinética de tipo Monod, explique cómo sería la ecuación que describa este comportamiento y qué significado tendrían los parámetros incluidos.

Referencias bibliográficas

- Acevedo F., Gentina J.C., Illanes A. (Eds.). 2002. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 273 pp.
- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2ª Ed. *Academic Press Inc.* London, 434 pp.
- Bailey J.E., Ollis D. 1987. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª Ed. Mc. *Graw-Hill Book Co.* 928 pp.
- Casablanca G., López Santín J. 1998. Ingeniería Bioquímica. *Editorial Síntesis*, Madrid España. 79-101.
- Fujio Y., Sambuichi M., Ueda S. 1973. Numerical method of the determination of $k_L a$ and respiration rate in biological systems. *Journal of Fermentation Technology*, 51: 154-158.
- Quintero R.R. 1993. Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones. Ed. *Alhambra Mexicana*. México. 322 pp.
- Welty J.R., Wilson R.E., Wicks C.E. 1979. Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer. 2ª Ed. *John Wiley and Sons*, 242 pp.

Práctica 7

Efecto de la aireación en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactores

Objetivos

- Poner en marcha y dar seguimiento a la operación de biorreactores en lote.
- Obtener experimentalmente las variables de respuesta: eficiencia (E), rendimientos ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$), y velocidades específicas (q_s , q_p , μ) de la fermentación alcohólica sin y con aireación.
- Observar experimentalmente el efecto de la aireación en la fermentación alcohólica.

Introducción

Como se sabe, el escalamiento es uno de los mayores problemas de la ingeniería bioquímica. Generalmente, en el laboratorio se trabaja cualquier tipo de cultivo en matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes (50 mL hasta 2 L). Sin embargo, existen reactores de 1 hasta 5 L para trabajo en laboratorio, cuyo manejo y funcionamiento es más parecido a los reactores a nivel piloto e incluso a escala industrial que los matraces Erlenmeyer. Dichos reactores pueden estar tan equipados como un reactor piloto (chaqueta para control de la temperatura, electrodo de O_2 , electrodo y controlador de pH, bomba peristáltica, etc.) o bien, pueden estar dotados solamente de los elementos básicos como el vaso de reactor, agitación y entrada para aire. El uso de reactores a nivel laboratorio ayuda a comprender el funcionamiento de los reactores a nivel piloto e, incluso, se pueden detectar algunos problemas que se presentan al momento de escalar, como la formación de espuma.

El metabolismo de los microorganismos y, por tanto, su crecimiento se ve afectado por factores ambientales como la composición del medio de cultivo, temperatura, pH y la disponibilidad de oxígeno (aireación). De acuerdo con sus necesidades de oxígeno, los microorganismos se clasifican en: (i) aerobios, que requieren oxígeno para su crecimiento y (ii) anaerobios, que no requieren oxígeno para su crecimiento. Dentro de los aerobios, existen los microaerófilos, que necesitan ambientes con presiones parciales de O_2 menores a 21%. Por su parte, los microorganismos anaerobios, pueden ser aerotolerantes, anaerobios estrictos o anaerobios facultativos. Los primeros, aunque no utilizan el oxígeno para crecer, toleran su presencia. Para los segundos, el oxígeno resulta tóxico y mueren en su presencia, mientras que los facultativos, pueden utilizar o no el oxígeno para su crecimiento. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un buen ejemplo de un microorganismo facultativo. Además, de acuerdo al ambiente en que se desarrolla, presenta diferencias en su crecimiento y producción de metabolitos. Es interesante poder observar experimentalmente estas diferencias.

Material

Primera sesión (fermentación)

Material	Reactivos
1 matraz Erlenmeyer de 2 L	Glucosa
1 probeta de 1000 mL	Peptona
1 pipeta Pasteur	Extracto de levadura
1 picnómetro	Solución amortiguadora pH 7.0 y 4.0
5 cajas de Petri de vidrio	Agua destilada
5 discos de papel filtro de microfibra de vidrio Whatman GF/F (0.7 micras)	Solución de hidróxido de sodio (10 N)
6 tubos de ensaye con tapón de rosca (50 mL)	Solución de ácido clorhídrico (10 N)
1 gradilla para tubos	Cultivo viable de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1 barra magnética	Hielo
1 espátula	Equipo
1 palangana de plástico	Potenciómetro
1 jeringa de 10 mL	Balanza
1 jeringa de 50 mL	Parrilla con calentamiento/agitación
1 cristalizador grande	Autoclave con canastilla y válvula
1 piseta con agua destilada	Biorreactor
1 termómetro	Congelador
Algodón	Refrigerador
Papel aluminio	Estufa a 70°C

Segunda sesión (análisis de muestras)

Material	Reactivos
1 Desecador	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
1 Vaso de precipitados de 500 mL	Hidróxido de sodio anhidro
10 Vasos de precipitados de 100 mL	Sulfito de sodio anhidro
10 Vasos de precipitados de 50 mL	Fenol
1 Picnómetro	Agua destilada
2 Pipetas de 10 mL	Hielo
2 Pipetas de 5 mL	Solución amortiguadora pH 7.0 y 4.0
4 Pipetas de 1 mL	
1 Probeta de 50 mL	
1 Probeta de 100 mL	
20 tubos de ensaye con tapón de rosca (10 mL)	
1 Pinza para tubo de ensaye	
1 Piseta	
1 Vórtex	
1 Espátula	
1 Espátula de punta	
1 Gradilla	
4 Barras magnéticas	
1 Termómetro	
2 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	
Algodón, papel aluminio	
Papel seda y papel filtro	
	Equipo
	Baño María
	Bomba de vacío
	Parrilla con calentamiento/agitación
	Miniequipo de destilación rápida
	Espectrofotómetro
	Potenciómetro
	Balanza analítica
	Estufa a 70°C
	Congelador
	Refrigerador

Procedimiento

La práctica se realizará en dos sesiones: (i) fermentación en un biorreactor de 2 L; (ii) análisis de muestras.

Primera sesión: fermentación

1. En un matraz de 2 L, preparar y esterilizar 1 L de medio de crecimiento para levadura (Anexo I). Esperar a que el medio alcance la temperatura ambiente (25-30°C).
2. Colocar el biorreactor estéril a 30°C con una agitación de 200 rpm, e inyectarle aire si realizarán la fermentación con aireación. Colocar los electrodos de pH y oxígeno disuelto (OD) previamente calibrados.
3. Inocular con 0.4-0.5 g/L de levadura seca.
4. Tomar muestras (35 mL) a diferentes tiempos: 0, 1, 2, 16, 24 h. Guardar las muestras en congelación ó refrigeración hasta la siguiente sesión, para su análisis.
5. Tomar lectura de los valores de temperatura, pH y OD a cada tiempo de muestreo.

Segunda sesión: análisis de muestras

Los análisis a realizar son: (i) crecimiento, mediante el peso seco de la biomasa producida; (ii) pH, por medición directa; (iii) azúcares reductores, por el método de DNS; (iv) producción de alcohol, por el método del picnómetro.

Para su análisis, las muestras se tratarán como se describe a continuación.

1. Determinación de biomasa:
 - a. Poner a peso constante los filtros de microfibras de vidrio en una estufa a 70°C.
 - b. Dejar enfriar los filtros en un desecador y tomar su peso final (peso 1).
 - c. Filtrar a vacío un volumen conocido (35 mL) de la muestra a través de los filtros a peso constante.
 - d. El filtrado se ocupará para medir el pH y para cuantificar los azúcares y el alcohol.
 - e. Meter los filtros con la biomasa a la estufa a 70°C durante 24 h.
 - f. Dejar enfriar en un desecador y determinar el peso seco de cada filtro con biomasa (peso 2).
 - g. Calcular la concentración de biomasa (peso seco) para cada muestra, mediante la relación de pesos entre los filtros de microfibras de vidrio con y sin biomasa. Para calcular la concentración de biomasa, debe relacionarse el peso seco de la biomasa con el volumen de suspensión que se filtró.
2. Determinación de pH. El pH se mide directamente en el filtrado de cada muestra, con un potenciómetro calibrado.
3. Determinación de azúcares. Los azúcares reductores se cuantifican por medio de la técnica de DNS (Práctica 1). En este caso, se debe usar 1 mL de la solución problema (filtrado) y realizar el mismo procedimiento empleado en la obtención de la curva patrón. Si el valor de DO es mayor al valor más alto de la curva patrón, debe repetirse la determinación haciendo una dilución de la muestra. En caso de hacer diluciones, debe considerarse el factor de dilución para realizar el cálculo.
4. Determinación de alcohol. El alcohol producido se determina por la técnica del picnómetro, para lo cual, se toman 30 mL del filtrado. El procedimiento es el siguiente:
 - a. Poner a peso constante el picnómetro en una estufa a 70°C.
 - b. Dejar enfriar el picnómetro en un desecador y tomar el peso final.
 - c. Llenar el picnómetro con agua destilada hasta aforar y tomar el peso con precisión.
 - d. Destilar 30 mL de la muestra filtrada (anotar el volumen exacto de la muestra destilada) y recuperarla en un vaso de precipitados.
 - e. Llenar el picnómetro con la muestra destilada hasta aforar y pesar con mucha precisión.
 - f. Determinar la gravedad específica, utilizando la siguiente relación:
 - g. Gravedad específica =
$$\frac{(\text{peso picnómetro} + \text{muestra}) - (\text{peso picnómetro solo})}{(\text{peso picnómetro} + \text{agua}) - (\text{peso picnómetro solo})}$$

- h. Con el valor calculado de la gravedad específica, buscar en las tablas de la AOAC a que porcentaje de alcohol corresponde.
- i. Con la siguiente relación, calcular el volumen de alcohol en la muestra:
- j.
$$\text{Alcohol (mL)} = \frac{\text{(volumen de la muestra que se destiló)} \text{ (valor de la tabla)}}{100}$$
- k. Con base en la densidad del etanol, se obtienen los gramos de etanol en la muestra destilada.
- l. Determinar la concentración de etanol producido en el reactor.

Resultados y discusión

1. Obtener las cinéticas de pH, crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de alcohol.
2. Determinar las siguientes variables de respuesta y reportarlas en la Tabla 20: eficiencia de consumo en glucosa (E), rendimientos ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$), tasas específicas de crecimiento celular (μ), de consumo de glucosa (q_s) y de producción de alcohol (q_p).
3. Comparar y discutir acerca de los resultados obtenidos en ambas fermentaciones (aerobia y anaerobia).

Tabla 20. Variables de respuesta de la fermentación alcohólica sin y con aireación.

Fermentación	E (%)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	μ (h ⁻¹)	q_s (h ⁻¹)	q_p (h ⁻¹)
Sin aireación						
Con aireación						

Cuestionario

1. Explique cómo afecta la aireación el metabolismo celular de *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Explique el fundamento de la técnica para cuantificar alcohol con el uso del picnómetro.
3. ¿Qué tipos de agitadores se emplean para los reactores, y cuáles son las ventajas o desventajas de su uso?
4. ¿Cuáles son los principales problemas del escalamiento de reactores?
5. ¿Qué tipo de modelo matemático se ajusta mejor al crecimiento en este reactor? ¿Por qué?

Referencias bibliográficas

- Aiba S., Humphrey A.E., Millis N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2ª Ed. *Academic Press Inc.* London. 434 pp.
- Bailey J.E., Ollis D. 1987. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª Ed. Mc. *Graw-Hill Book Co.* 928 pp.
- Manginot C., Roustan J.L., Sablayrolles J.M. 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 511-517.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Kenneth H. (Ed.). Vol. 2, 15ª Ed. *Association of Official Analytical Chemists, Inc.* Arlington, Virginia, EUA. 1231-1249 pp.
- Parés R., Juárez A. 1997. Bioquímica de los microorganismos. *Reverté.* Barcelona, España. 380 pp.
- Pirt S.J. 1985. Principles of microbes cell cultivation. 2ª Ed. *John Wiley & Sons.* NY USA 284 pp.
- Quintero R.R. 1993. Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones. Ed. *Alhambra Mexicana.* México. 332 pp.
- Stanbury P.F., Whitaker A. 1995. Principles of Fermentation Technology. 1ª Ed. *Pergamon Press.* Gran Bretaña, 357 pp.
- Wagner J.R., Otero-Ramble M.A. Guerrero-Legarreta I. 2008. Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes de la industria alimentaria. 1ª Ed. *Editorial Universidad Nacional de Quilmes.* Bernal, Argentina. 246 pp.

Práctica 8

Determinación de la distribución de tiempos de residencia (DTR) en reactores continuos

Objetivo

Aprender una técnica usada en la industria para la determinación del tiempo de residencia de un fluido en reactores continuos, y distinguir la diferencia entre los reactores continuos ideales y los no ideales, determinando la distribución de tiempos de residencia (DTR) y el patrón de flujo en reactores continuos.

Introducción

La DTR se utiliza para encontrar el patrón de mezclado del líquido en un reactor continuo e indica el tiempo de residencia de un compuesto en el prototipo de reactor que se está estudiando. Con base en las curvas de DTR se puede determinar si el flujo es de tipo pistón o de mezcla completa y si dentro del recipiente se encuentran zonas muertas o con mezclado deficiente.

En la DTR influye el estado de agregación del líquido, su tendencia a agruparse formando zonas muertas y la velocidad con la que un trazador es mezclado con el líquido en el recipiente. Esta variable se puede calcular como una función de la respuesta a un impulso recibido, es decir, mediante la introducción de una cantidad conocida de un trazador al sistema. La DTR se considera el área bajo la curva en una gráfica de la concentración del trazador (C) contra el tiempo, la cual puede integrarse como una curva de distribución normal, considerando que el área bajo una curva normal es siempre la unidad. Es conocida como curva E y es la que debe analizarse para determinar si el comportamiento del fluido se acerca a la idealidad.

$$\text{Área bajo la curva} = \int_0^{\infty} E \, dt = 1$$

El impulso recibido puede ser de tipo escalón, en donde hay un aumento instantáneo en la concentración del trazador y se mantiene constante por un periodo de tiempo. También puede ser un pulso, en donde una cantidad determinada de trazador se introduce una sola vez de manera instantánea. En este caso, el área bajo la curva se define como:

$$\int_0^{\infty} C \, dt = 1 \text{ la cual dividida entre el área bajo la curva queda como:}$$

$$\int_0^{\infty} \frac{C}{Q} \, dt = 1$$

Donde Q es el área bajo la curva en una gráfica de concentración contra tiempo.

$$Q \text{ se puede expresar como } Q = \int_0^{\infty} C \, dt.$$

En donde el área bajo la curva es igual a la concentración del trazador detectado durante un periodo diferencial de tiempo. Esto se muestra gráficamente en la Figura 1.

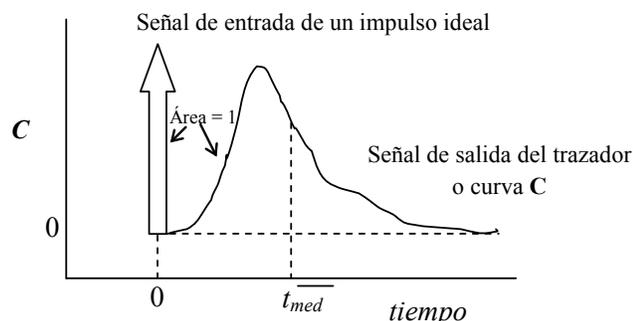


Figura 1. Perfil del pulso del trazador introducido y de la concentración detectada a la salida del sistema.

Material

General

Material	Reactivos
3 microceldas para espectrofotómetro (1.5 mL)	Azul de metileno
1 gradilla	
1 jeringa de 10 mL	
1 matraz aforado de 1000 mL	
1 matraz aforado de 100 mL	
1 microespátula	
2 pipetas de 5 y 10 mL	
20 tubos de ensaye	
1 vaso de precipitados de 50 mL	
1 piseta	
	Equipo
	Espectrofotómetro

Reactor de lecho empacado/fluidizado

Material	Equipo
1 Columna de vidrio de 300 mL con alimentación en la parte inferior y salida en la parte superior	Bomba peristáltica de 10 a 100 rpm
manguera # 14 para la alimentación	Cabezales con sus tornillos
manguera #16 para la recirculación	Controlador de velocidad
1 matraz Erlenmeyer de 4 L	
2 nueces para soporte	
2 pinzas de tres dedos	
1 tapón de hule # 10	
Empaque: cilindros de vidrio (lecho empacado) o cuentas de plástico (lecho fluidizado)	

Reactor de mezcla completa

Material	Equipo
manguera # 14 para la alimentación	Bomba peristáltica de 10 a 100 rpm
1 matraz Erlenmeyer de 4 L	Controlador de velocidad
	Cabezal con sus tornillos
	Reactor de jarra con turbina equipado

Procedimiento

En esta práctica se utilizarán reactores continuos de lecho empacado y de jarra con turbina, a los que se les introducirá un pulso de trazador y se medirá la concentración del mismo a la salida de los reactores. Cada equipo trabajará con uno de los prototipos utilizando diferentes flujos volumétricos de alimentación.

I. Instalación y puesta en marcha de los reactores

1. Armar los reactores de acuerdo a los diagramas que se muestran en las figuras 2 y 3. Todo el material a utilizar debe estar limpio.
2. Hacer las conexiones de vidrio que sean necesarias y de los tamaños adecuados.
3. Hacer las horadaciones necesarias a los tapones de hule.
4. Armar los tapones con la tubería de vidrio y con la manguera necesaria.

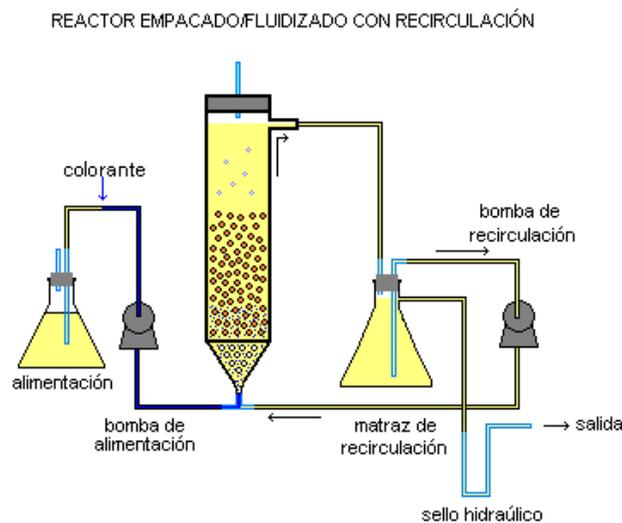


Figura 2. Reactor de lecho empacado/fluidizado

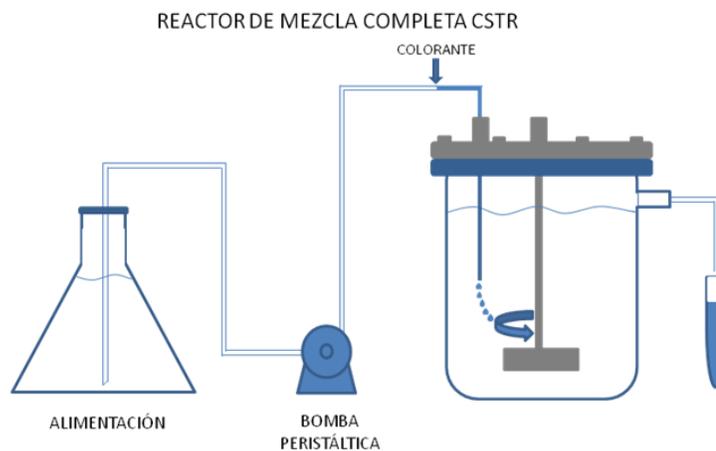


Figura 3. Reactor de mezcla completa CSTR

II. Determinación del tiempo de residencia hidráulico

Medir el volumen del reactor y determinar los tiempos de retención hidráulica o tasas de dilución con los que se operarán los reactores por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{TRH} \text{ ó } \frac{1}{D} = \frac{(\text{Volumen del reactor (mL)})}{(\text{Gasto de alimentación (L/h)})} [=] \text{h}$$

En el caso del reactor empacado, llenar la columna con agua y medir el volumen adicionado (volumen nominal). Rellenar la columna del reactor con anillos o cilindros de vidrio de 0.5 cm hasta 5 cm debajo de la oliva de salida y llenar la columna con agua nuevamente midiendo el volumen adicionado (volumen útil). El volumen muerto es la diferencia entre el volumen nominal y el volumen útil.

III. Calibración de la bomba de alimentación

1. Determinar los gastos de alimentación y de recirculación con ayuda de una probeta y un cronómetro.
2. Encender la bomba a una velocidad determinada, dependiendo del TRH a utilizar y medir con precisión el volumen de líquido desplazado por la bomba en una probeta de 25 mL y el tiempo transcurrido durante el llenado de la probeta. El cociente de ambos valores dará la velocidad de gasto volumétrico (mL/min) al que se encuentra la bomba.
3. Una vez encontrada la velocidad a la que la bomba operará, repetir varias veces la medición para cerciorarse de que el flujo es correcto.
4. Trabajar con tiempos de retención hidráulica no mayores a 2 h para verificar la recuperación de todo el colorante dentro del tiempo de la sesión de práctica.
5. Instalar el reactor y fijarlo al soporte de aluminio.
6. Verificar que las conexiones entre mangueras, tubería de vidrio y tapones de hule sellen perfectamente.
7. Llenar con agua el sistema completo y conectarlo a la bomba de alimentación.
8. Poner en funcionamiento las bombas y verificar fugas o taponamientos observando que el agua de salida esté limpia, es decir, la lectura en el espectrofotómetro para una muestra deberá ser de cero.

IV. Curva estándar de trazador

Como trazador se utilizará azul de metileno. La concentración de colorante en las muestras de salida de cada reactor se determinará por medio de una curva patrón. Para lo anterior:

1. Preparar una solución de azul de metileno de 25 mg/L y hacer las diluciones indicadas en la Tabla 21.
2. Leer la densidad óptica a 640 nm inmediatamente después de preparar los tubos.
3. Hacer una regresión lineal con los datos de la curva estándar para obtener los coeficientes para la interpretación de resultados.

Tabla 21. Curva patrón de azul de metileno

Tubo	Colorante (mL)	Agua (mL)	Concentración (mg/L)	DO ₁	DO ₂	DO _{prom}
1	0.0	5.0	0.0			
2	0.1	4.9	0.5			
3	0.2	4.8	1.0			
4	0.3	4.7	1.5			
5	0.4	4.6	2.0			
6	0.5	4.5	2.5			
7	0.6	4.4	3.0			
8	0.7	4.3	3.5			
9	0.8	4.2	4.0			
10	0.9	4.1	4.5			
11	1.0	4.0	5.0			

V. Adición y medición del trazador

1. Inyectar en la manguera de alimentación de los reactores 5 mL de una solución de colorante (250 mg/L). Este procedimiento debe realizarse lo más rápido posible, sin causar turbulencia y sin introducir burbujas de aire.
2. A partir de este momento, muestrear la salida, colectando de 5 a 10 mL de muestra en celdas para espectrofotómetro y leer la densidad óptica a 640 nm inmediatamente.
3. Muestrear durante el tiempo necesario hasta que la curva formada por las lecturas de las muestras sea una asíntota con respecto al tiempo.

Resultados y discusión

1. Calcular el volumen útil, volumen nominal, volumen muerto del sistema utilizado.
2. Calcular la velocidad de gasto volumétrico para cada TRH utilizado.
3. Registrar los datos de densidad óptica obtenidos para cada muestra tomada y presentarlos en la Tabla 22.
4. Construir las gráficas de concentración de colorante vs. tiempo para cada TRH.
5. Realizar los cálculos para el área bajo la curva, tiempo promedio y varianza y construir la curva C con los datos obtenidos para área bajo la curva.
6. Reportar el porcentaje de recuperación de colorante con respecto al colorante administrado.

7. Reportar el patrón de flujo encontrado.
8. Discutir los resultados obtenidos, comparando el patrón de flujo encontrado en cada tipo de reactor con respecto al reportado en la bibliografía.

Tabla 22. Curva del trazador obtenida del reactor.

Muestra	Tiempo(min)	DO	Concentración(mg/L)
1	0		
2			
3			
4			
...			
...			
...			
...			
...			
n	t		

Cuestionario

1. ¿Qué es el tiempo de retención hidráulico? ¿Qué es la tasa de dilución?
2. ¿Qué es la distribución de tiempos de residencia? ¿Qué técnicas se utilizan para determinarla? ¿Para qué se utiliza el análisis de DTR? ¿Cuál es su relación con la tasa de dilución D?
3. ¿Qué se entiende por patrón de flujo pistón y flujo de mezcla completa?
4. ¿Cómo es una curva de DTR para reactores que tienen zonas muertas?
5. ¿Qué es el flujo no ideal? ¿Cómo afectaría al metabolismo microbiano?

Referencias bibliográficas

Bailey J.E., Ollis D.F. 1988. Biochemical Engineering Fundamentals. 2ª Ed. Mc. *Graw-Hill Book Co.* 984 pp.

Levenspiel O. 1999. Chemical Reaction Engineering. 3ª Ed. *John Wiley & Sons.* NY USA, 688 pp.

Anexo 1.

Preparación de reactivos

Reactivo DNS

1. Disolver 10 g de ácido 2,3-dinitrosalicílico (DNS) en 900 ml de una solución de NaOH al 1 %. Mezclar hasta disolver.
2. Adicionar 1 g de sulfito de sodio anhidro y 2 g de fenol. Mezclar hasta disolver.
3. Aforar a 1000 ml con la misma solución de NaOH.
4. Guardar esta solución en un frasco ámbar en la oscuridad.

Reactivos para cuantificación de proteína por el método de Lowry

1. Preparar 100 ml de una solución de NaOH 10 N.
2. Solución A. Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N. Preparar 1000 mL.
3. Solución B. CuSO_4 al 1% en agua destilada. Preparar 250 mL.
4. Solución C. Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua destilada. Preparar 250 mL.
5. Solución D. Mezclar 1 mL de B + 1 mL de C y aforar a 50 mL con A. Esta solución se prepara al momento de utilizarla.
6. Reactivo de Folin-Ciocalteu: Preparar una solución 1:1 con agua destilada.

Reactivo de Bradford

1. Para preparar 100 mL de solución:
Disolver 10 mg de Azul Brillante Coomassie G-250 en 5 mL de etanol al 95%
Agregar 10 mL de ácido fosfórico al 85% (p/v)
2. Mezclar y aforar a 100 mL con agua destilada
3. Diluir este volumen final (100 mL) con cuatro volúmenes de agua destilada (400 mL)
4. Filtrar a través de papel Whatman N° 1
5. Conservar en una botella de vidrio opaco a temperatura ambiente

Medio para levadura

1. Pesar las siguientes cantidades de cada reactivo, para preparar un litro de medio
 - Glucosa, 10 g
 - Peptona, 5 g
 - Extracto de levadura, 1 g
2. Ajustar el pH a 5 y esterilizar a 15 lb/in² (121°C) durante 15 min.

Amortiguador de acetatos 0.1 M (diferente pH)

1. Preparar las siguientes soluciones stock:
Solución A: ácido acético 0.2 M
Solución B: acetato de sodio 0.2 M
2. Mezclar X ml de A + Y ml de B, aforando a 100 mL, de acuerdo con la siguiente Tabla:

X	Y	pH
23.2	1.9	3.6
20.5	4.5	4.0
12.8	12.3	4.6
5.3	19.8	5.2
2.4	22.6	5.6

Manual de prácticas del laboratorio de Ingeniería Bioquímica
Se terminó de imprimir en noviembre de 2013,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600