



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 281 861**

⑤1 Int. Cl.:
B01F 15/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **05008715 .4**

⑧6 Fecha de presentación : **21.04.2005**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1588758**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

⑤4 Título: **Agitador.**

③0 Prioridad: **22.04.2004 EP 04009501**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

⑦3 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
4070 Basel, CH

⑦2 Inventor/es: **Eisenkraetzer, Detlef y**
Haug, Andreas

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agitador.

5 La invención se refiere a un agitador, el cual es adecuado, en particular, para el empleo en biorreactores, y se refiere también al empleo de dicho agitador.

En los biorreactores, los agitadores se emplean esencialmente para equilibrar las diferencias de temperatura y las diferencias de concentraciones de varios constituyentes. Los agitadores intensifican el intercambio de calor entre los
10 elementos de termostatación y el caldo de fermentación. Además, los agitadores en los biorreactores evitan que las células se sedimenten y por ello estén inhomogéneamente distribuidas durante la fermentación. Otra finalidad de los agitadores en los biorreactores es la de dispersar la fase gas en el caldo de fermentación.

En biotecnología, se emplean varios tipos de agitadores. El tipo de agitador más frecuentemente empleado es el
15 agitador de disco. Un agitador de disco estándar es, por ejemplo, la turbina Rushton que tiene seis palas dispuestas perpendicularmente. Este agitador genera un flujo radial respecto al eje del agitador. Encima y debajo del agitador, se forman torbellinos de flujo, los cuales dan por resultado un efecto de alta dispersión. Otra variante de agitador es el agitador de palas inclinadas. Este es un agitador en el cual el ángulo de ataque de las palas (con respecto al eje del agitador) puede cambiarse, pero normalmente es de 45°. Un agitador de palas inclinadas comprende principalmente
20 una dirección de transporte axial con un componente radial y por lo tanto, se logra un mezclado altamente efectivo. Una desventaja de los agitadores de disco o agitadores de palas inclinadas es, por ejemplo, que dichos agitadores, en particular en el caso de una carga alta de gas, son fácilmente desbordados, y como resultado, ya no son capaces de dispersar completamente el gas que sale. Finalmente, se emplean agitadores de hélice en la fermentación celular, pero con mucha menos extensión que los agitadores estándar de disco o los agitadores de palas inclinadas. El flujo en un
25 agitador de hélice está dirigido principalmente en sentido axial.

Los fundamentos sobre la tecnología de los agitadores en los biorreactores se encuentran descritos, por ejemplo, en Riet, van't Tramper, J., Basic Bioreactor Design ("Diseño básico de biorreactores"), capítulo 4: Cinética, Marcel Dekker Inc., 1991; Tatterson, G.B., Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks ("Mezclado de fluidos y dispersión de gas en depósitos agitados"), McGraw-Hill, Inc., 1991 y Bailey, J.E. y Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals ("Fundamentos de la ingeniería bioquímica"), segunda edición, McGraw-Hill, Inc., 1986. En la patente
30 EP 0 745 666, se describe un biorreactor que está equipado con agitadores de disco. Los agitadores de disco están descritos también en las patentes DE 23 49 106 y DE 23 51 763.

35 La patente US 4.468.130 describe un agitador de palas inclinadas con las palas del agitador arqueadas, el ángulo de las cuales varía 16° respecto a la pala del agitador. El ángulo en la punta de la pala del agitador es de 16 a 32°.

La patente US 4.896.971 describe un agitador de palas inclinadas que tiene las palas del agitador torcidas, siendo el ángulo de torcido aproximadamente de 8 a 12°. El ángulo en la parte superior de la pala del agitador es de
40 18 a 34°.

La patente US 5.052.892 describe un agitador que tiene las palas del agitador que están dobladas una vez en el centro, siendo el ángulo entre las dos partes de las palas del agitador de 20 ó 30°. La patente US 5.297.938 describe igualmente un agitador con las palas del agitador dobladas, siendo el ángulo formado por las mismas de 7,5 a 22,5°.

45 La patente US 5.316.443 describe un agitador que tiene una sección transversal en forma de gancho. La patente US 5.326.226 describe un agitador que tiene las palas del agitador torcidas y un ángulo de las palas del agitador, entre 25 y 45°.

50 La patente US 5.791.780 describe un agitador en el cual las palas del agitador tienen una sección transversal semicircular o semielíptica.

La patente FR 1 600 744 describe un agitador en el cual las palas del agitador tienen una sección transversal principalmente triangular.

55 La patente DE 94 00 938 U describe un agitador en el cual las palas del agitador tienen una pala principal interna conectada con una pala lateral externa.

La invención se refiere a un agitador que tiene por lo menos dos palas del agitador esencialmente rectangulares (1)
60 las cuales están dispuestas radialmente respecto al eje de rotación (2) y las cuales están inclinadas formando un ángulo de ataque en la dirección de rotación relativa a un plano perpendicular al eje de rotación (2), en donde las palas del agitador constan de segmentos de igual tamaño (5), y en donde el ángulo de ataque de la pala individual del agitador, varía continuamente o escalonadamente de 25° a 35° en el extremo superior de 55° a 65° en el extremo inferior de la pala del agitador (de preferencia de 30° a 60°). Los ángulos de ataque de las palas individuales del agitador (1) son
65 de preferencia, idénticas. De preferencia, el agitador tiene de dos a ocho, con particular preferencia, cuatro palas del agitador (1), sobre un plano. En función del tamaño del biorreactor, las palas del agitador (1) pueden estar dispuestas en una pluralidad de planos encima y debajo unos de otros; de uno a seis planos son convenientes.

ES 2 281 861 T3

De preferencia, las palas del agitador (1) están fijadas a un cilindro hueco (3) el cual sirve para recibir el árbol del agitador (4). Si es apropiado, el cilindro vacío (3) está unido al árbol del agitador mediante unos medios de fijación. Este cilindro vacío (3) con las palas del agitador (1) fijadas al mismo, recibe de aquí en adelante el nombre de elemento agitador. Los elementos agitadores tienen por lo tanto de preferencia, una región anular interna radial la cual encierra el árbol agitador (4), a la cual región anular están unidas de dos a ocho palas del agitador a intervalos regulares unas de otras.

De preferencia, las palas del agitador (1) constan de varios segmentos (5), cuyos ángulos de ataque son diferentes.

Con más preferencia, una pala del agitador (1) consta de segmentos de igual tamaño (5), cuyos ángulos de ataque son diferentes, con particular preferencia, el ángulo de ataque del segmento superior está entre 25° y 35° y el segmento inferior entre 55° y 65°.

Con especial preferencia, una pala del agitador (1) consta de tres segmentos de igual tamaño (5), cuyos ángulos de ataque son diferentes, con particular preferencia el ángulo de ataque del segmento superior es de 30°, el segmento central, 45° y el del segmento inferior, 60°.

El ratio de los diámetros de una pala individual del agitador está de preferencia en el margen de 0,3 a 0,5, con particular preferencia, de 0,35 a 0,45 (de acuerdo con la norma DIN 28131), el ratio d/D es el diámetro del agitador/diámetro interno del reactor), y el ratio de la altura de la pala del agitador al diámetro del agitador (d/h) es de preferencia, de 0,1 a 0,3, y con particular preferencia, de 0,1 a 0,15 (ver figura 1).

Las dimensiones de los agitadores preferidos son por ejemplo:

d/D	0,33	0,4
h/d	0,14	0,2
d	350 mm	350 mm

La forma de una pala del agitador de la invención es rectangular, pudiendo estar redondeados los bordes y las esquinas. Además, se prefiere que la pala del agitador tenga la forma de una sección cilíndrica y/o esté doblada una o varias veces para lograr el ángulo de ataque de la invención.

La forma del biorreactor no es crítica. Normalmente se emplea un depósito cilíndrico.

Los parámetros esenciales para la evaluación de la eficiencia y rendimiento de un agitador son los parámetros, potencia de entrada [W/m^3], coeficiente de transporte de oxígeno [$k_L a$ (litros/hora)], tiempo de mezclado [S] y crecimiento celular [concentración de células y vitalidad].

El coeficiente de transporte de oxígeno $k_L a$ se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$k_L a = \frac{OTR}{(C * O_2 - CO_2)}$$

$k_L a$: coeficiente de transferencia de oxígeno

OTR: ratio de transferencia de oxígeno [moles/(litros.hora)]

$C * O_2$: concentración de equilibrio del oxígeno en el límite de fases

CO_2 : concentración de oxígeno en el interior de la suspensión [moles/litro].

El valor $k_L a$ puede determinarse por varios métodos. Se ha observado muchas veces que el intervalo de medición es función del método. En la presente invención, se empleó el "método dinámico" para determinar $k_L a$ (Zlokarnik, M., Rührtechnik - Theorie und Praxis ("Técnica de la agitación - Teoría y práctica"), Editorial Springer, Heidelberg, Nueva York, 1999).

Los ejemplos, referencias y figuras que figuran a continuación, describen la invención, cuyo ámbito de protección viene dado con más detalle en las reivindicaciones de la patente. Los métodos descritos deben tomarse como ejemplos los cuales, incluso después de ser modificados describen todavía el tema-objeto de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 Agitador representado esquemáticamente h: altura del agitador (proyectado en vertical, ver figura 2)

Figura 2 Agitador de palas inclinadas (SBR tipo 1)

Figura 3 Agitador de palas inclinadas (SBR tipo 2)

Figura 4 Agitador de la invención (SBR tipo 3) en forma de palas

Figura 5 Agitador de la invención en forma de palas

Figura 6 Coeficiente de transporte de oxígeno como una función de la velocidad de rotación

Figura 7 Tiempo de mezclado como una función de la velocidad de rotación

Figura 8 Gráfico mostrando el coeficiente de transporte de oxígeno como una función de la velocidad de rotación para un SBR tipo 1 y un agitador SBR tipo 3, en un fermentador de 1000 litros.

Ejemplo 1

Fermentador

Para la fermentación, se empleó un fermentador con un depósito agitado capaz de un volumen de trabajo de 10 litros para el cultivo de una línea celular CHO. Para producir el medio de cultivo, los constituyentes individuales se suplementan en agua purificada calentada (tipo 2) en un recipiente esterilizado. Se ajusta la osmolalidad media (0,29 osmoles/kg) como en la determinación experimental del valor $k_L a$ mediante NaCl. El pH de 7,1 puede ajustarse mediante la adición de agentes correctores.

El equipo de accionamiento consiste en una construcción de sobremesa, con un motor suspendido de accionamiento eléctrico. Se trata de un motor de corriente continua de 0,75 kW con un intervalo de velocidad de rotación de 0 a 1500 rpm. Para formar el equipo de suministro, se combinan los aparatos, conexiones y accesorios necesarios para proporcionar y eliminar vapor, agua de refrigeración, aguas residuales, aire comprimido, dióxido de carbono, nitrógeno y agentes correctores. Estos incluyen el sistema de calefacción, estación para el mezclado de gas y la válvula de control de la presión. Además, el suministro de energía eléctrica está incluido en el equipo de suministro.

El biorreactor empleado tiene un ratio altura-diámetro (H/D) de 2,0. El reactor está construido con una base cóncava, una tapa plana y un cristal de inspección longitudinal. La calefacción se efectúa por medio de un intercambiador de calor en forma de camisa ($V = 3$ litros). En el recipiente hay cuatro deflectores con un ancho de $0,1 \times D$.

Tres portales Ingold de 25 mm y dos de 19 mm, están dispuestos lateralmente en la pared del recipiente. En función de las necesidades de instrumentación del control de mediciones de la fermentación, pueden emplearse aquí, un electrodo pO_2 , un electrodo de pH, un sensor de temperatura (PT 100), una válvula de muestreo (CV 25), una sonda de turbidez y un electrodo de pCO_2 .

Elementos de agitador empleados

Los elementos del agitador son de acero inoxidable y están fijados mediante dos tornillos gruesos sobre el árbol del agitador, el cual está situado centralmente en el fermentador. Su dirección de rotación se ha escogido contraria a la de las agujas de un reloj. El número de elementos de agitador por fermentador fue de tres para el agitador estándar de disco y de dos para los agitadores de palas inclinadas.

Agitador estándar de disco (SSR)

El agitador estándar de disco que transporta radialmente, consta de un disco dispuesto horizontalmente al cual están simétricamente fijados seis discos perpendiculares (DIN 28 131). Se empleó un agitador con un ratio de diámetros (D/d) de 0,4.

ES 2 281 861 T3

Agitador de palas inclinadas tipo 1 (SBR tipo 1) (figura 2)

El ángulo de ataque de las palas fue variable. Se estudió la entrada de oxígeno para un ángulo de 45° (SBR tipo 1) y de 60° (SBR tipo 1_60°).

Dimensiones:

d:	118 cm
ancho de la pala d_B :	40 cm
largo de la pala:	95 cm
ratio de diámetros ($d/D = 0,55$)	

Agitador de palas inclinadas tipo 2 (SBR tipo 2) (figura 3)

En contraste con el agitador de palas inclinadas tipo 1, el agitador de palas inclinadas tipo 2 fue diseñado con una superficie de pala más estrecha pero más larga. La pala está ligeramente inclinada en los extremos. La posición de los bordes doblados es opuesta entre sí (en forma de Z).

Dimensiones:

d:	118 cm
ancho de pala d_B :	16/29 cm
longitud de las palas:	115 cm
longitud de las palas sin los bordes doblados:	93 cm
ratio de diámetros ($d/D = 0,55$)	

Agitador de la invención de palas inclinadas (SBR tipo 3) (figuras 4 y 5)

El agitador de palas inclinadas de la invención SBR tipo 3 se subdivide en tres segmentos de igual tamaño (cada uno de 32 cm de longitud). En contraste con el agitador de palas inclinadas tipo 2, los segmentos exteriores se doblaron en la misma dirección [en forma de C]. Los dos segmentos exteriores están inclinados 15° con respecto al segmento central en la dirección de rotación.

Dimensiones:

d/D :	0,335
d:	350 mm
h/d :	0,139

Medición de los parámetros del proceso

Medición del oxígeno

La concentración de oxígeno disuelto se determinó empleando un electrodo de oxígeno Clark (Metler Toledo, InPro® 6000).

Medición de la temperatura, presión y pH

El pH y la temperatura se midieron en el sistema de fermentación por medio de ensayos instalados en el anillo de pruebas. Para la medición de la temperatura, se empleó un termómetro de resistencia PY 100. Su exactitud se comprobó durante la esterilización y en los intervalos de tiempo prescritos durante la fermentación mediante un termómetro de contacto (tipo CS 20). El pH se determinó por medio de una combinación de electrodo de pH de Ingold. Antes de la instalación, se calibró este electrodo con soluciones tampón de pH = 4,01 y pH = 7,0. Para la medición de la presión, se empleó un electrodo de presión de pasta.

Medición de la turbidez

Para determinar los tiempos de mezclado, se empleó un sistema de medición de la turbidez de Aquasant Messtechnik AG (AS81) con AF44).

ES 2 281 861 T3

Determinación experimental del valor $k_L a$

El coeficiente de transporte de oxígeno se determinó mediante el método de saturación.

5 El sistema de fermentación se carga con 10 litros de agua desionizada después de la instalación de la introducción de gas y el elemento agitador objeto del ensayo. Todos los elementos internos (sondas, deflectores y tuberías ascendentes) y parámetros del proceso ($p = 1$ bar, $Y = 37^\circ\text{C}$, osmolalidad = 0,3 osmoles/kg) corresponden a los de la fermentación. La osmolalidad se ajusta y comprueba por medio de NaCl. Después del calentamiento y la calibración del electrodo de $p\text{O}_2$, todo el oxígeno disuelto puede eliminarse del medio mediante la introducción de gas nitrógeno (gas 1 = 0,5 litros/minuto, velocidad de rotación = 250 rpm).

En el momento $t=0$, empieza la introducción de aire puro comprimido, y se ajusta la velocidad de rotación correspondiente. La concentración de oxígeno disuelto aumenta con la concentración de saturación de aproximadamente 6,6 g/litro. En el intervalo de tres experimentos, el electrodo $p\text{O}_2$ se recalibra y también en el caso de un uso relativamente prolongado del mismo medio, se comprueba diariamente la osmolalidad del mismo.

El valor $k_L a$ se calculó mediante la ecuación

$$k_L a = - \frac{\ln[1 - (C_{O_2} \cdot L / C^*_{O_2} \cdot L)]}{t}$$

Se determinó como una función de la velocidad de rotación y la velocidad del flujo volumétrico de gas alimentado (gas 1). Para estos parámetros, se han seleccionado intervalos y pasos, que corresponden a los de la fermentación.

25 El líquido de ensayo empleado en los experimentos fue una solución 0,15 molar de NaCl (8,7 g/litro). Esta tiene unas propiedades hidrodinámicas (comportamiento coalescente, concentración de la saturación de oxígeno), similares a las del medio.

30 Empleando el agitador de palas inclinadas tipo 3 de la invención, se pudo lograr un aumento marcadamente mayor en el valor $k_L a$, comparado con todos los otros sistemas de agitación, no solamente aumentando la velocidad de rotación sino también aumentando la velocidad de introducción del gas. El valor $k_L a$ que se obtuvo a una velocidad de rotación de 200 rpm cuando se empleó el agitador de palas inclinadas tipo 1, experimentó en este agitador solamente un pequeño aumento. Los coeficientes de transporte de oxígeno logrados mediante el agitador estándar de disco a 250 rpm pudieron ya lograrse con los agitadores de palas inclinadas a velocidades de rotación de 100 a 150 rpm (figura 6).

Determinación del tiempo de mezclado

40 El tiempo de mezclado se determinó empleando un sistema de medición de la turbidez empleando leche como indicador (todas las demás condiciones, similares a la determinación del valor $k_L a$). A una concentración del indicador de 5 ml/litro, se estableció una señal de medición del 85% del valor máximo medido. El cambio en la turbidez fue seguido mediante la sonda de turbidez instalada en el anillo de la sonda y se detectó por medio del registrador de compensación. La condición de terminación para el experimento fue una señal de medición constante del 85%. El tiempo para lograr la calidad de mezclado deseada del 95%, es el tiempo de mezclado.

45 Empleando el agitador de palas inclinadas, los tiempos de mezclado pudieron disminuirse hasta un 70%. Empleando el agitador de palas inclinadas tipo 3, el tiempo de mezclado pudo disminuirse en aproximadamente el 40% comparado con los otros agitadores de palas inclinadas (figura 7).

Ejemplo 2

Este experimento se efectuó de forma análoga al ejemplo 1, pero con un fermentador de depósito agitado con un volumen de trabajo de 1000 litros. El fermentador se llenó con una solución acuosa 0,15 molar de NaCl a 37°C .

55 Se compararon dos tipos diferentes de agitadores con respecto a su coeficiente de transferencia de oxígeno, $K_L a$, a saber, un agitador estándar de palas inclinadas (SBR tipo 1) y un agitador de la invención (SBR tipo 3). Antes de introducir el aire puro comprimido en el fermentador, se eliminó el oxígeno mediante la introducción de nitrógeno (20 L/minuto, 150 rpm). A continuación se introdujo aire puro a diferentes velocidades (gas 1=10, 12 ó 20 litros/minuto).

60 Los resultados del experimento empleando dos diferentes electrodos de oxígeno (electrodo 1 y electrodo 2) se representan en la gráfica de la figura 8 como “coeficiente de transferencia de oxígeno” respecto a la “velocidad de rotación”).

65 Empleando el agitador de palas inclinadas de la invención, tipo 3, el valor $k_L a$ pudo aumentarse por un factor entre 1,5 y 2,7 comparado con el agitador estándar del tipo 1.

Lista de referencias

Bailey, J.E. y Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals (“Fundamentos de Ingeniería Bioquímica”), segunda edición, *McGraw-Hill, Inc.*, 1986

5

DE 23 49 106

DE 23 51 763

10

EP 0 745 666

Riet, van’t Tramper, J., Basic Bioreactor Design (“Diseño básico de biorreactores”), capítulo 4: *Kinetics*, *Marcel Dekker Inc.*, 1991

15

Tatterson, G.B., Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks (“Mezclado de fluidos y dispersión de gas en depósitos agitados”), *McGraw-Hill, Inc.*, 1991

Patente US 4.468.130

20

Patente US 4.896.971

Patente US 5.052.892

Patente US 5.297.938

25

Patente US 5.316.443

Patente US 5.326.226

30

Patente US 5.791.780

Zlokarnik, M., Rührtechnik-Theorie and Praxis (“Teoría y práctica de la técnica de agitación”), editorial *Springer, Heidelberg, Nueva York* 1999

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agitador que tiene por lo menos dos palas de agitador (1), las cuales están dispuestas radialmente respecto al eje de rotación (2) y las cuales están inclinadas en un ángulo de ataque en la dirección de rotación respecto al plano perpendicular al eje de rotación (2), en donde las palas del agitador (1) constan de segmentos de igual tamaño (5) y el ángulo de ataque de los segmentos de las palas individuales del agitador (1) varía continuamente o escalonadamente, desde 25° hasta 35° en el extremo superior, y desde 55° hasta 65° en el extremo inferior de la pala del agitador.
- 10 2. Elemento de agitador de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende un cilindro hueco (3) al cual están fijadas las palas del agitador, y el cual sirve para recibir el árbol del agitador (4).
3. Agitador de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque el cilindro hueco (3) está unido al árbol del agitador (4) mediante unos medios de fijación.
- 15 4. Agitador de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la pala del agitador (1) consta de tres segmentos del mismo tamaño (5) y los ángulos de ataque son diferentes.
- 20 5. Agitador de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque el ángulo de ataque del segmento superior es de 30°, el del segmento central es de 45° y el del segmento inferior es de 60°.
6. Agitador de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el ratio de diámetros es de 0,3 a 0,5.
- 25 7. Agitador de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el ratio de la altura del agitador al diámetro del agitador, es de 0,1 a 0,3.
8. Agitador de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por tener de dos a ocho palas de agitador (1).

Técnica anterior

Fig. 1

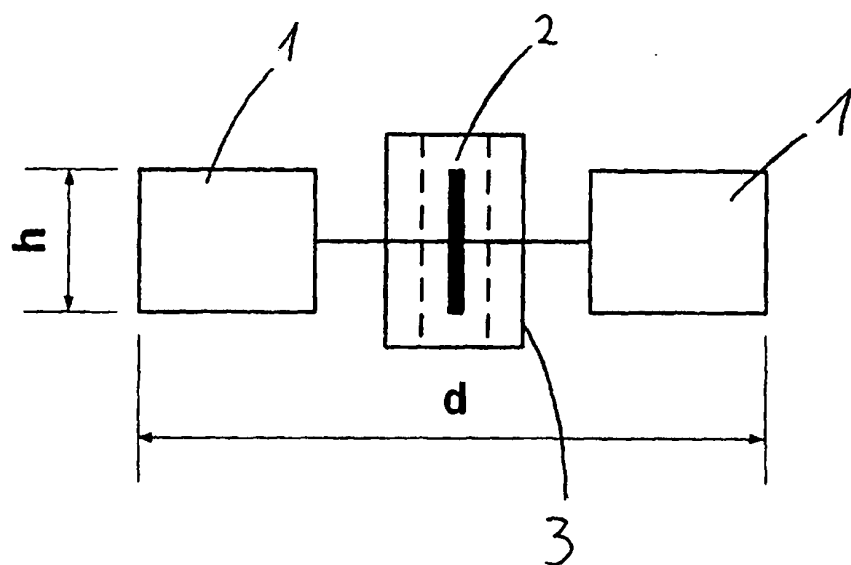
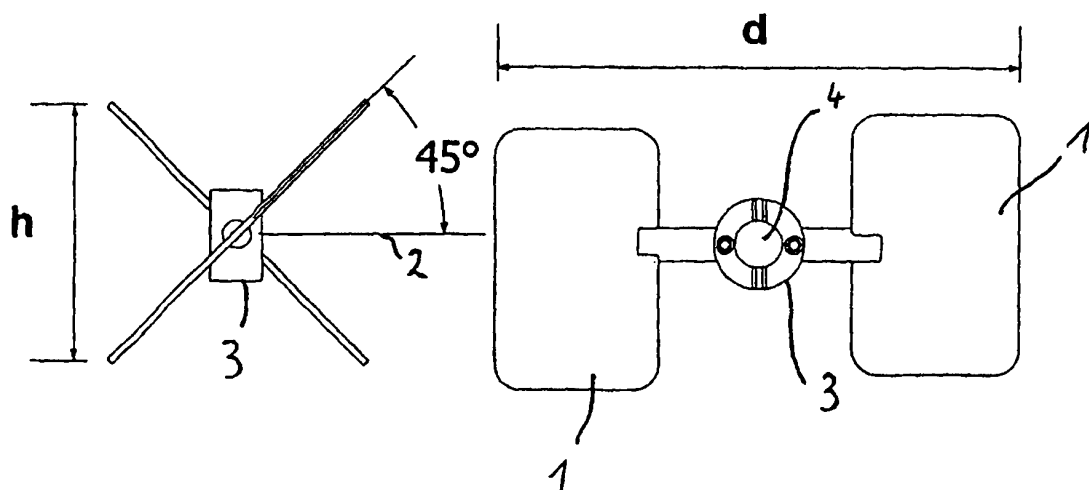


Fig. 2

Técnica anterior



Técnica anterior

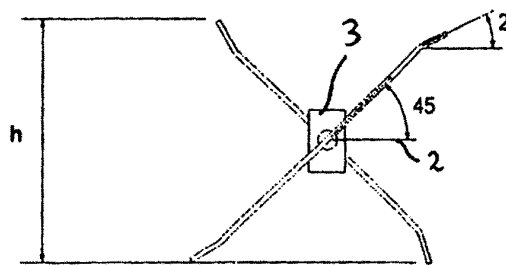


Fig. 3

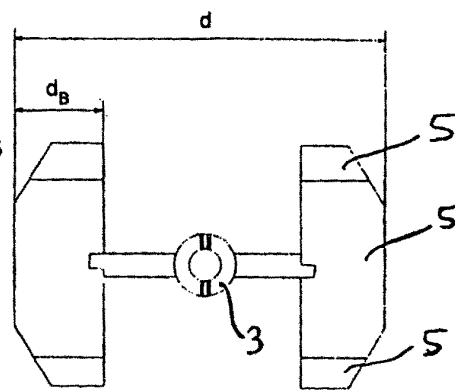
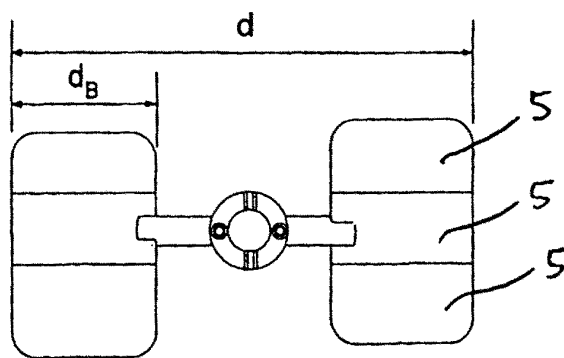
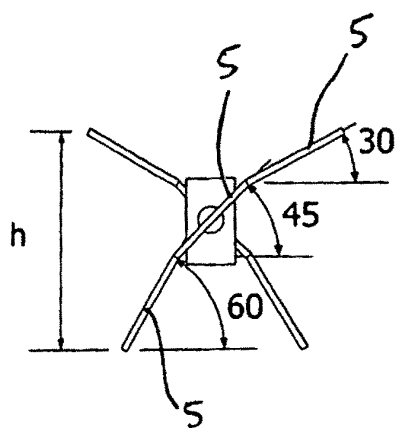


Fig. 4



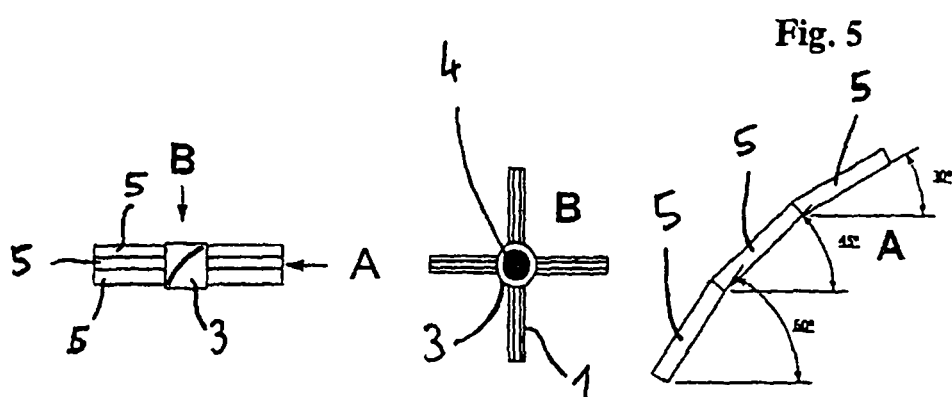


Fig. 6

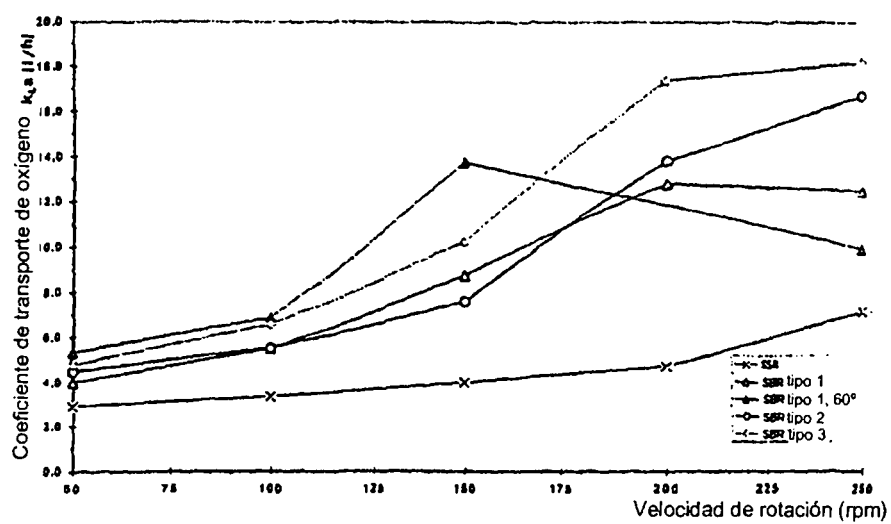


Fig. 7

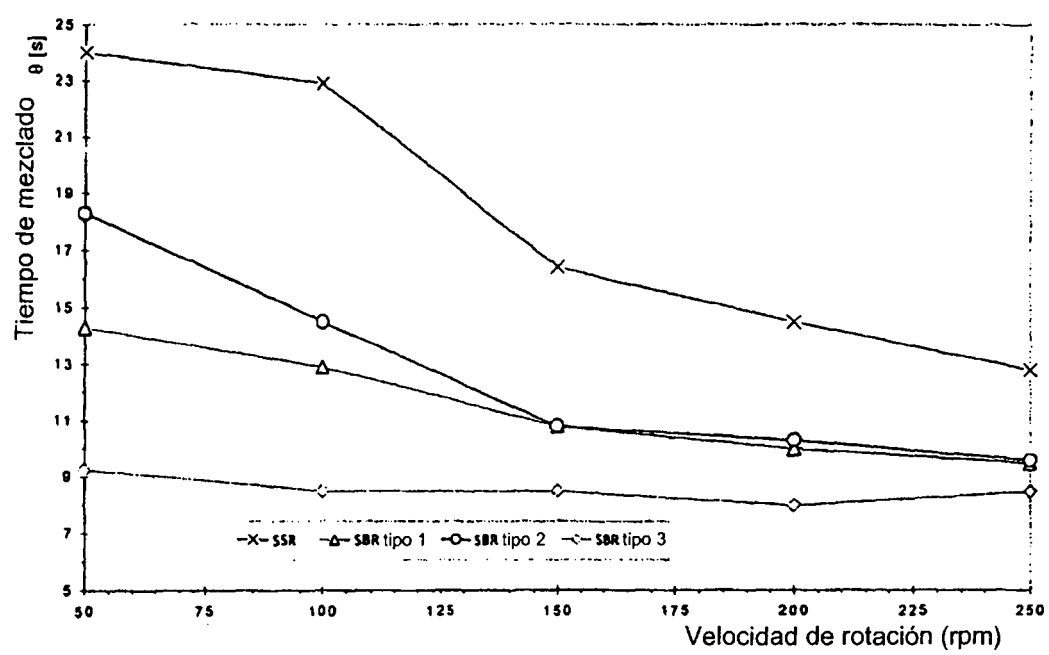


Fig. 8

