

GUIA COMPLEMENTARIA

MEDIDA DE PARAMETROS FISICOS Y QUIMICOS EN CULTIVOS MICROBIANOS

Medida de pH

Para la medida de este parámetro se utiliza por lo general un electrodo combinado de vidrio. En realidad, éste consta de dos electrodos; uno, el de vidrio, cuyo potencial depende de las variaciones de pH, y un electrodo de referencia cuyo potencial no varía con el pH. El potencial del electrodo de trabajo sigue la ley de Nernst

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[H^+]_{Int.}}{[H^+]_{Ext.}}$$

o sea que varía tanto con el pH como con la temperatura. A 25°C el potencial de este electrodo varía unos 57 mV/unidad de pH.

Debe tenerse en cuenta que ésta es una medida potenciométrica, o sea que se mide a velocidad de reacción nula, en el equilibrio; por lo tanto durante la medida no circula corriente por los electrodos. Este tipo de electrodos poseen una gran resistencia interna (de unas cuantas decenas de MΩ), por lo que la circulación de corriente por el electrodo por más pequeña que sea produce grandes errores en la medida del pH.

A manera de ejemplo, supongamos que circula a través del electrodo una ínfima corriente $1nA = 1.10^{-9}A$, la resistencia típica de un electrodo es $40 M\Omega = 4 \times 10^7\Omega$, la caída de potencial que se produce será $V = I.R$, $V = 10^{-9}A \cdot 4 \times 10^7\Omega = 4.10^{-2}V = 40 \text{ mv}$, lo que equivale a 0,7 unidades de pH.

Calibración del electrodo: En general los peachimetros se calibran con dos soluciones patrón. Con la primera de ellas, de un valor central (en general 7.00) se fija el 0 del instrumento sin variar la relación $\Delta m / \Delta pH$, o sea que generaría una serie de rectas paralelas, Fig. 1.

Con la segunda solución, de un valor inferior o superior a 7.00 (dependiendo de la solución problema que se vaya a medir, en general 4.00 o 10.00)se varía la relación $\Delta mv / \Delta pH$ sin alterar la posición del 0 (Fig. 2). Cada equipo posee una secuencia operativa que depende del fabricante.

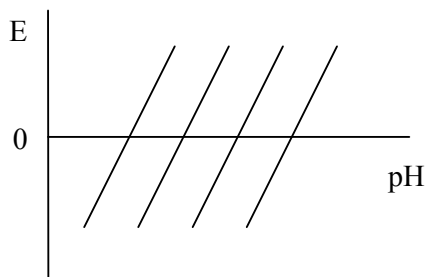


Fig. 1

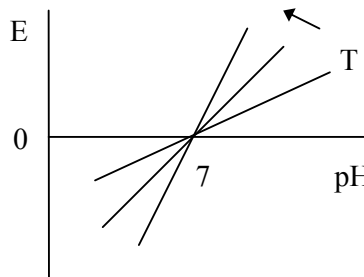


Fig. 2

conocido, una de pH 7 o lo más cercano posible a éste y otro ácida o alcalina ($pH \approx 4$ o 10) dependiendo de la zona donde se va a trabajar.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

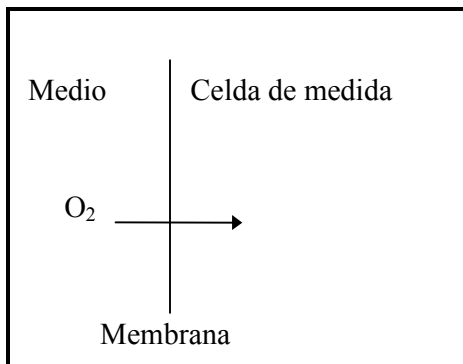
La generalidad de los electrodos esterilizables por calor soportan temperaturas de hasta 130°C sin dañarse, siempre y cuando el ambiente esté saturado en agua. En el caso de esterilización por métodos químicos hay que tener la precaución de no utilizar mezclas fuertemente deshidratantes que pueden dañar al electrodo de medida.

Como resultado de la esterilización puede ocurrir que el electrodo pierda su calibración, y en la mayoría de los casos no se puede calibrar en dos puntos como se describió anteriormente, ya sea porque está inserto en el reactor en contacto con el medio de cultivo, o porque una recalibración implicaría el riesgo de perder la esterilidad. En estos casos se procede a recalibrar al electrodo en forma indirecta, esto se logra sacando una muestra del medio de cultivo del reactor, tomarle pH en otro peachimetro, y luego, con la perilla de ΔpH ajustar al valor correcto.

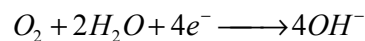
Medida de oxígeno disuelto:

Para la medida de este parámetro se utiliza por lo general un electrodo de difusión que consta fundamentalmente de una membrana permeable al oxígeno que separa la celda de medida del medio de fermentación. Existen fundamentalmente dos tipos de electrodos, potenciométricos (miden el potencial de equilibrio a velocidad de reacción 0) y amperométricos (que miden la corriente generada en la celda de medida por la reducción del oxígeno que atraviesa la membrana hacia la celda); y a su vez estos últimos pueden dividirse en dos tipos, los polarográficos (en los cuales se les coloca un potencial externo de polarización) y los galvánicos (que funcionan como una pila y generan su propia FEM).

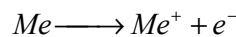
En realidad, en el único tipo de electrodo en que hay transporte difusional de oxígeno a través de la membrana en el momento de medida es en los amperométricos y en consecuencia la dependencia de la lectura con la temperatura en este caso se debe a la variación de la difusividad del oxígeno en la membrana, que en la mayoría de los casos es del orden del 2 %/°C. En cambio en los potenciométricos sigue la variación de la ley de Nernst.



En el caso de electrodos amperométricos la reacción catódica es:



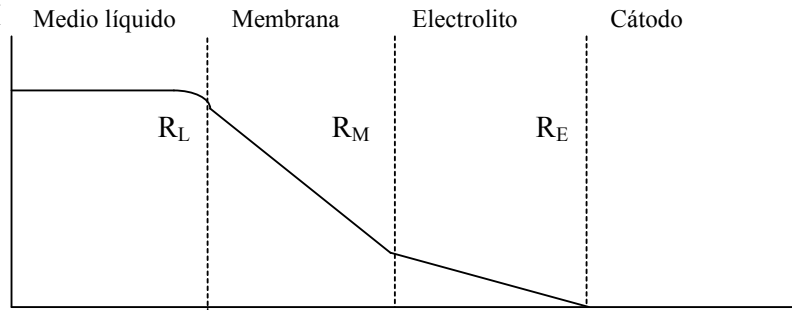
y la anódica para los galvánicos, donde el ánodo está constituido por un metal no noble:



para los polarográficos, los electrones necesarios para la reducción del O₂ son suministrados exteriormente por el potencial aplicado al electrodo.

Si hacemos una gráfica de los gradientes de concentración para los electrodos galvánicos obtendríamos

Donde R_L, R_m y R_E son respectivamente las resistencias al flujo de oxígeno en el líquido, la membrana y el electrolito. Aquí vemos que las resistencias más importantes son R_L y R_m, pues R_E puede achicarse tanto como se quiera al acercar el cátodo a la membrana.



Si analizamos el modelo propuesto, es fácil concluir que R_L depende mucho de la viscosidad del medio líquido, mientras R_m permanece invariante, lo que daría como resultado una gran dependencia del electrodo a las características reológicas del medio. Para que esto no suceda, se modifica (aumenta) el espesor de la membrana de tal manera que $\frac{R_L}{R_m} \leq 0,05$. De esta manera se

obtiene un electrodo prácticamente independiente de la viscosidad del medio de cultivo, pero menos sensitivo a los cambios en la concentración de oxígeno disuelto. En general los tiempos de respuesta para este tipo de electrodos son lentos (90% de la respuesta dentro de los 10-100 segundos) pero son muy adecuados para monitorear los cambios producidos en un cultivo que normalmente son mucho más lentos. En el caso de querer medir cinéticas más rápidas (métodos dinámicos) se deben hacer correcciones debido a estas limitaciones

Calibración del electrodo: Para entender la forma de calibrar estos electrodos se debe acotar en principio que estos electrodos lo que miden en realidad no es la concentración de oxígeno disuelto, sino la actividad del oxígeno en solución. Para entender esto, se utilizará el siguiente ejemplo:

Intuitivamente sabemos que la concentración de oxígeno en el aire, en agua destilada en equilibrio con aire y en una solución saturada en NaCl en equilibrio con aire son distintas (21%, ~ 8 ppm y ~ 2 ppm respectivamente).

Si colocamos el mismo electrodo de oxígeno en los tres medios mencionados obtendremos la misma respuesta, lo que claramente no estamos midiendo concentración, sino una propiedad común a los 3 sistemas que es la actividad de O_2 .

Normalmente los instrumentos utilizados para medir oxígeno disuelto poseen dos perillas, una de ajuste de cero y la otra de calibración. Generalmente la compensación por temperatura es automática debido a un sensor de temperatura alojado en el interior del electrodo.

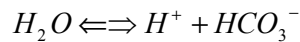
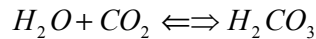
Ajuste de 0: Se coloca al electrodo en una corriente de N_2 gaseosa, o en una solución libre de O_2 (saturada en Na o con ditionito de sodio) y con la perilla “cero” se lleva la indicación a este valor (este control produce, al igual que en el caso del pH un corrimiento del 0 del instrumento).

Calibración del instrumento: Se coloca el electrodo en una corriente de aire o en el fermentador sin sembrar con el medio de cultivo aereándose y agitándose y utilizando la perilla de calibración se lo lleva al valor deseado. Este último valor varía de acuerdo a las intenciones del usuario, pues si elegimos 100 el instrumento nos indicará el porcentaje de saturación de oxígeno que hay en solución. Si elegimos 159,6 el instrumento indicará la pO_2 en mm Hg en equilibrio con la solución (ley de Henry). Y si conocemos la solubilidad del O_2 en nuestro medio y elegimos dicho valor, el instrumento nos indicará la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo siempre y cuando no varíe su solubilidad a lo largo de todo el proceso. De todos modos el valor más usado es el porcentaje de saturación.

Medida del CO_2 disuelto:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Para la medida de este parámetro se utiliza una modificación del electrodo de pH. Dicha modificación consiste en ubicar al electrodo en una cámara con una solución de NaHCO_3 , separada del medio de cultivo por una membrana permeable al CO_2 . Dentro de la cámara se establecen los siguientes equilibrios:



Lo que nos indica que una variación en la pCO_2 se traducirá en una variación de pH. Si no se cuenta con un instrumento para medir pCO_2 se puede utilizar un peachimetro, teniendo en cuenta que la linealidad se cumple para $\log \text{pCO}_2$ vs. pH.

Calibración del electrodo: Esto se logra sumergiendo el electrodo en el medio de cultivo y haciendo burbujear una mezcla gaseosa con tenor de CO_2 conocido.

Medida de O_2 en gases: Para esto se pueden utilizar dos tipos de sensores.

a) Paramagnético: Es un instrumento absoluto, es decir que no requiere calibración. Su principio de funcionamiento se basa en las propiedades paramagnéticas del O_2 (capacidad de los electrones desapareados de la molécula de acoplarse a un campo magnético). Consta de una celda de flujo de cuarzo rodeada de un fuerte imán permanente. En el interior de la celda se halla un pequeño imán suspendido por hilos de cuarzo. El cambio en la concentración de O_2 en el interior de la celda, hace variar la posición de equilibrio del pequeño imán, en cuya superficie se halla adosado un pequeño espejo que refleja la luz de una fuente fija sobre una escala graduada. Al ser el ángulo de deflexión del pequeño imán proporcional a la cantidad de O_2 presente, la proyección sobre la escala graduada nos indica la $[\text{O}_2]$ presente, a presión normal.

b) Galvanométrico: El instrumento posee en su interior una cámara donde se encuentra alojado un electrodo de O_2 de tipo galvánico como el ya descrito.

Calibración: Se utiliza un gas de concentración de oxígeno conocida (por ej. aire 20,9 %) y con la perilla de calibración se lo lleva al valor correcto.

Para efectuar determinaciones de O_2 en gases, es muy importante tener en cuenta la humedad del gas a medir, por su efecto dilutorio sobre la concentración del resto de los gases. Para evitar su influencia se suele utilizar un tren de secado de gases antes de entrar al instrumento de medida. Se debe poner especial atención tanto en los materiales adsorbentes utilizados como en el volumen del tren a fin de evitar la retención del gas a medir, que pueden producir serios errores en las determinaciones efectuadas.

Normalmente, los equipos para determinación de gases deben trabajar en un rango de caudal y presión estrechos.

Medida de CO_2 en gases: El instrumento utilizado en la medición de este parámetro se basa en las propiedades del CO_2 de absorber en IR, en resumidas cuentas es un espectrofotómetro de IR, con algunas modificaciones, en el cual los gases a medir deben cumplir con los mismos requisitos que en el caso anterior (secos y en un cierto rango de caudal y presión).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

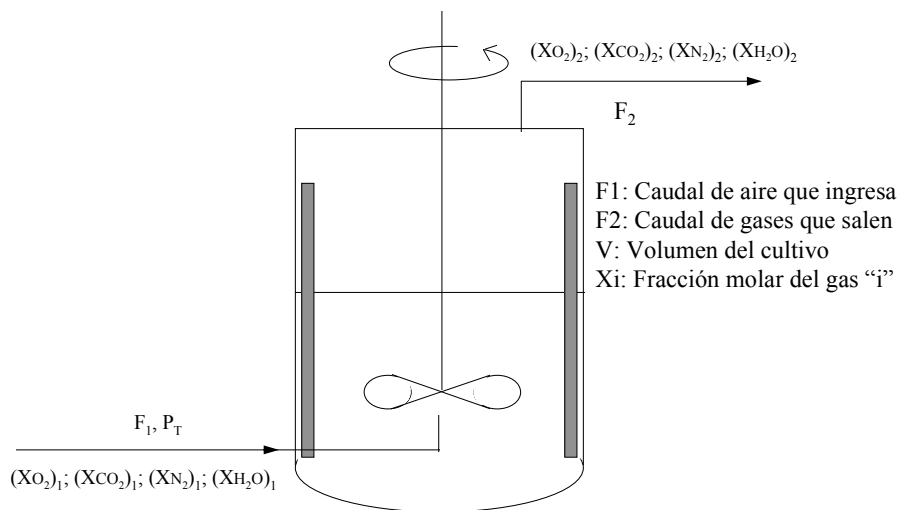
La mayoría de estos instrumentos poseen varias escalas de medida cuya elección depende de la concentración de CO₂ a determinar. Los distintos rangos de medida corresponden a distintas longitudes de celda de medida.

Calibración del instrumento: Este equipo posee tres perillas, una de rango cuya función ya fue explicada, una de cero y otra de ganancia. Se hace circular un gas libre de CO₂ (o con muy bajo tenor, p. ej. aire, que posee 0,03 de CO₂) y con la perilla de ajuste de cero, se lleva la lectura a dicho valor. Luego se hace circular por el equipo una corriente de gas de concentración de CO₂ conocida y cercana a la medida, y con la perilla de ajuste de ganancia se lleva al valor correcto.

Utilización de los parámetros medidos

Puesto que estamos en condiciones de medir O₂ y CO₂ tanto en fase líquida como gaseosa, veremos ahora qué información podemos obtener de ella.

Cálculo de la velocidad de consumo de O₂: r_{O₂}



Cálculo de la velocidad de consumo de O₂ y de producción de CO₂ en base a la composición de gases de salida en función del caudal de entrada solamente.

Teniendo en cuenta la ecuación general de los gases:

$$P_g \cdot V_g = n_g \cdot R \cdot T \longrightarrow C_g = \frac{n_g}{V_g} = \frac{P_g}{R \cdot T} \left(\frac{mol}{L_{gas}} \right)$$

y la ley de Dalton:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

$$P_{gi} = P_T \cdot X_i \longrightarrow C_{gi} = \frac{P_T \cdot X_i}{R \cdot T}$$

donde

X_i = fracción molar del gas i

el consumo de O_2 puede ser calculado a través de un balance en fase gaseosa suponiendo que, durante el tiempo de medida, existe un estado estacionario.

Considerando que no hay variación de la concentración de O_2 disuelto el balance indica que:

$$r_{O_2} = \frac{1}{V_L} (F_1 \cdot (C_{gO_2})_1 - F_2 \cdot (C_{gO_2})_2)$$

Esta aproximación es válida debido a que el O_2 posee muy baja solubilidad en medios acuosos.

Si se introduce la ecuación de los gases, se obtiene la expresión que permite calcular el consumo en litros de O_2 por litro de medio y por hora (si el flujo de aire esta en litros por hora)

$$r_{O_2} = \frac{1}{V_L} \left(\frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{O_2})_1}{R \cdot T_1} - \frac{F_2 \cdot P_{T_2} \cdot (X_{O_2})_2}{R \cdot T_2} \right)$$

Esta expresión puede ser utilizada cuando se miden experimentalmente los caudales de entrada y salida de gases o cuando se mide sólo uno de ellos pero el cociente respiratorio es uno o cercano a uno y por tanto los caudales son iguales. Si esto no ocurre, hay expresar uno de los caudales en función del otro y esto se realiza en función del balance de nitrógeno. Debido a que no es consumido ni generado por el metabolismo, la cantidad total de N_2 por unidad de tiempo que ingresa al reactor es igual a la que sale del mismo (dentro del balance se incluye al Ar pero, por sencillez, sólo se indica al N_2).

$$\text{Para el } N_2 \text{ y Ar : } \frac{\text{moles}_{N_2}(\text{ingresan})}{h} = \frac{\text{moles}_{N_2}(\text{salen})}{h}$$

expresando las concentraciones de estos gases en base a la ecuación de los gases, queda:

$$(F_1 \cdot (C_{gN_2})_1 = F_2 \cdot (C_{gN_2})_2) \longrightarrow \frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{N_2})_1}{R \cdot T_1} = \frac{F_2 \cdot P_{T_2} \cdot (X_{N_2})_2}{R \cdot T_2}$$

De esta forma puede ponerse un caudal en función de otro, si se determina experimentalmente el flujo de ingreso, el de egreso queda:

$$F_2 = \frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{N_2})_1 \cdot R \cdot T_2}{R \cdot T_1 \cdot P_{T_2} \cdot (X_{N_2})_2}$$

introduciendo este valor en la ecuación de balance:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

$$r_{O_2} = \frac{1}{V_L} \left(\frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{O_2})_1}{R \cdot T_1} - \frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{N_2})_1 \cdot T_2}{T_1 \cdot P_{T_2} \cdot (X_{N_2})_2} \cdot \frac{P_{T_2} \cdot (X_{O_2})_2}{R \cdot T_2} \right)$$

reordenando

$$r_{O_2} = \frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{N_2})_1}{R \cdot T_1 \cdot V_L} \cdot \left(\frac{(X_{O_2})_1}{(X_{N_2})_1} - \frac{(X_{O_2})_2}{(X_{N_2})_2} \right)$$

y expresando la fracción molar de N₂ en función de las de O₂ y CO₂ a través de la ley de Dalton:

$$X_{N_2} = 1 - X_{O_2} - X_{CO_2} - X_{H_2O}$$

se obtiene:

$$r_{O_2} = \frac{F_1 \cdot P_{T_1} \cdot (X_{N_2})_1}{R \cdot T_1 \cdot V_L} \cdot \left(\frac{(X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1 - (X_{H_2O})_1} - \frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2 - (X_{H_2O})_2} \right)$$

si el aire viene de un compresor esta deshumidificado, puede despreciarse (X_{H₂O})₁ con lo que nos queda:

$$r_{O_2} = \frac{F_1 \cdot (X_{N_2})_1 \cdot P_{T_1} \cdot 60}{V_L \cdot R \cdot T_1} \cdot \left(\frac{(X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1} - \frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2 - (X_{H_2O})_2} \right)$$

que expresa la velocidad de consumo de O₂ en función de variables medibles experimentalmente. Los factores 60 y 22.4 convierten minutos a horas (si el flujo de aire se mide en litros por minuto) y de litros de O₂ a moles respectivamente. Con un planteo semejante se puede deducir la ecuación de calculo de la velocidad de producción de CO₂, la cual resulta

$$r_{CO_2} = - \frac{F_1 \cdot (X_{N_2})_1 \cdot P_{T_1} \cdot 60}{V_L \cdot R \cdot T_1} \cdot \left(\frac{(X_{CO_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1} - \frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2 - (X_{H_2O})_2} \right)$$

En este caso puede despreciarse el primer término del paréntesis ya que la concentración de CO₂ al ingreso

Es posible realizar algunas simplificaciones antes de usar las ec. (6) y (8). Normalmente el aire que se le suministra al biorreactor proviene de un compresor, lo cual causa su deshumidificación, y aunque ésta no sea total se puede suponer, sin cometer un gran error, que (X_{H₂O})₁ ≈ 0. Por otra parte el contenido de CO₂ en el aire es sumamente bajo (X_{CO₂})₁ = 3 · 10⁻⁴, con lo cual la composición del aire que ingresa al biorreactor estará dada entonces por:

$$(X_{O_2})_1 = 0,21$$

$$(X_{N_2})_1 = 0,79$$

$$(X_{CO_2})_1 \approx 0$$

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Hemos visto que antes de analizar los gases de salida es conveniente secarlos por lo que $(X_{H_2O})_2 = 0$. Por tanto las ec. (6) y (8) se reducen a:

$$r_{O_2} = -\frac{F_1 \cdot (X_{N_2})_1 \cdot P_{T_1} \cdot 60}{V_L \cdot R \cdot T_1} \cdot \left(\frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} - \frac{(X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1} \right)$$

$$r_{CO_2} = \frac{F_1 \cdot (X_{N_2})_1 \cdot P_{T_1} \cdot 60}{V_L \cdot R \cdot T_1} \cdot \left(\frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} \right)$$

Cociente respiratorio: C.R.

El cociente respiratorio durante el cultivo estará dado por la relación $C.R. = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$

Este es un parámetro muy importante ya que indica qué tipo de metabolismo está realizando el microorganismo. Por ej. si la fuente de carbono y energía del medio de cultivo es un hidrato de carbono, valores de C.R. cercanos a 1 indicarán un metabolismo aeróbico, mientras que valores mayores que 1 indicarán un metabolismo parcialmente anaeróbico.

Una de las causas por las que esto último puede ocurrir es que suministro de O_2 sea insuficiente y por tanto parte del hidrato de carbono sea derivado hacia rutas anaeróbicas (ej. formación de etanol en levaduras). Para confirmar si realmente el suministro de O_2 es insuficiente, bastará con observar cual es el porcentaje de saturación de O_2 disuelto que indica electrodo. Si éste es inferior a 5% de saturación (término medio) significa que el suministro de O_2 es insuficiente y por tanto deberemos aumentar F_1 y agitar más el cultivo (normalmente con esto último ya basta). En cambio si el porcentaje de saturación es superior al valor indicado, el problema es inherente a la regulación del metabolismo microbiano. Por ejemplo en ciertas circunstancias las levaduras arrojan un valor de CR > 1 aunque el % de saturación de O_2 disuelto sea muy superior al 5% (efecto glucosa).

Si el CR = 1, cabe simplificar aún más la ec. (9) y (10), pues si cada volumen de O_2 que se consume es reemplazado por otro igual de CO_2 implica que $F_1 = F_2$ y por tanto la ec. (1) se reduce a:

$$r_{O_2} = \frac{-F_1}{V} \left((X_{O_2})_2 - 0,21 \right) \quad (12)$$

y para el CO_2 :

$$r_{CO_2} = \frac{F_1}{V} (X_{CO_2})_2 \quad (13)$$

Una forma simple de averiguar si el CR es cercano a 1 consiste en sumar $(X_{O_2})_2$ con $(X_{CO_2})_2$; si se cumple que $(X_{O_2})_2 + (X_{CO_2})_2 = 0,21$ (14)

significa que cada volumen de O_2 consumido fue reemplazado por otro igual de CO_2 producido, y por tanto CR = 1.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Cálculo de la cantidad total de O₂ consumido y CO₂ producido:

Tanto r_{O_2} como r_{CO_2} varían constantemente durante el cultivo, tomando valores muy pequeños al principio (porque hay pocos microorganismos) para ir incrementándose posteriormente hasta alcanzar un máximo y luego decaen cuando el cultivo llega a un fin. El área bajo las curvas de r_{O_2} vs. t y r_{CO_2} vs. t nos da la cantidad total de O₂ y CO₂ consumido y producido respectivamente.