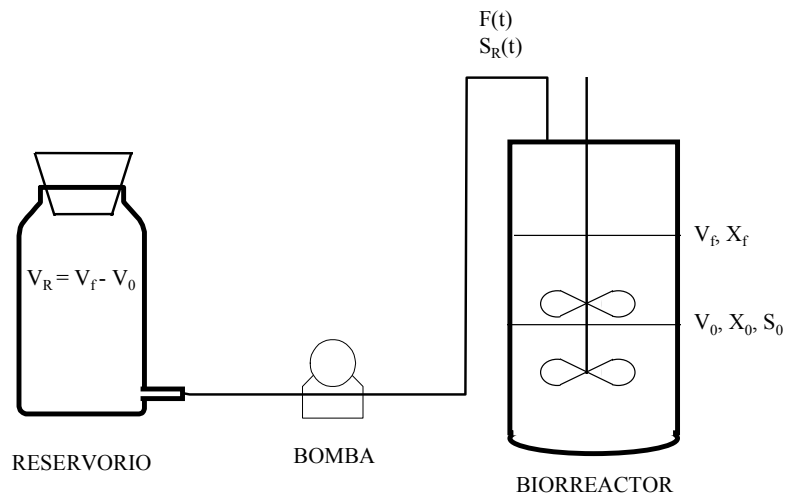


TRABAJO PRACTICO CULTIVO DISCONTINUO ALIMENTADO (BATCH ALIMENTADO)

Otro modo de operar un biorreactor es empleando la técnica de batch alimentado (BA) o fed batch. Esta técnica se define como un cultivo en batch donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo.

El BA es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados. Así, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa.

ESQUEMA



Donde $F(t)$: caudal de alimentación

$S_f(t)$: concentración de sustrato de la alimentación

V_f : volumen final de trabajo

V_0 : volumen al inicio de la alimentación

X_0 : concentración de biomasa al inicio de la alimentación

S_0 : concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación

El cultivo BA se inicia a partir de un cultivo en batch, por lo que V_0 , X_0 y S_0 son las condiciones finales de dicho batch.

Es posible elegir distintas condiciones de alimentación, ya sea mediante el empleo de caudales variables ($F = F(t)$), o bien mediante la variación de la concentración de sustrato

limitante ($S_r=S_r(t)$). En el caso del Trabajo Práctico se utilizará el sistema más simple, es decir $F=cte$ y $S_r=cte$.

PRODUCCION DE BIOMASA: ECUACIONES Y DISEÑO

El cultivo puede describirse matemáticamente. La resolución de las ecuaciones así obtenidas permitirá calcular la evolución de la biomasa durante el cultivo, la velocidad específica de crecimiento, y la productividad. Asimismo se podrán determinar parámetros de diseño, tales como F y S_r .

Para estudiar la evolución de X durante el cultivo se deben plantear las ecuaciones de balance de materia.

SUSTRATO

acumulación = suministro - consumo

$$(1) \frac{d(S \cdot V)}{dt} = F S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}}$$

En este caso el volumen no es constante, como ocurre en cultivos en batch o en continuo. Por lo tanto la expresión (1) quedará:

$$(2) V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = F \cdot S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}}$$

La condición final del batch es $S = 0$, pues, como se intenta controlar μ , S no puede ser saturante (recordar a Monod).

Si $S \approx 0$, $dS/dt = 0$, con lo que (2) se transforma en

$$(3) F \cdot S_R - \frac{\mu X V}{Y_{x/s}} = 0$$

de aquí, y recordando que $r_x = \mu \cdot X$

$$(4) F \cdot S_R = \frac{r_x V}{Y_{x/s}}$$

esta ecuación indica que la velocidad de producción de biomasa se acomoda a la velocidad de suministro de sustrato, es decir que r_x puede controlarse "externamente", modificando F y/o S_r .

La ecuación (3) es en realidad un límite superior ya que dados μ , X y V , cualquier par de valores F , S_r que satisfagan la condición

$$(4) F \cdot S_R \leq \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{x/s}}$$

harán que la velocidad de crecimiento esté limitada por la velocidad de alimentación. Esta ecuación (3) será muy útil en el momento de diseñar la alimentación.

BIOMASA

La velocidad de acumulación de biomasa será:

$$(5) \frac{d(xV)}{dt} = \mu X V \text{ o bien } \frac{d(xV)}{dt} = r_x V$$

o, reordenando,

$$(6) r_x = \frac{1}{V} \frac{d(xV)}{dt}$$

Si se reemplaza en (4) se obtiene

$$(7) F \cdot S_R = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{d(xV)}{dt}$$

que indica que la velocidad de acumulación de biomasa depende de la velocidad de alimentación de sustrato.

Integrando (7), se llega a

$$(8) X V = x_o V_o + Y_{x/s} F S_R t$$

Uno de los objetivos planteados es conocer cómo varía la concentración de biomasa con el tiempo. En cultivo en batch, al ser $V = \text{cte}$, $X \cdot V$ es proporcional a X . En BA V no es constante, sino que varía con el tiempo ($F = dV/dt$). Integrando se tiene

$$(9) V = V_o + F t$$

reemplazando en (8) y despejando X , se tendrá

$$(10) X = \frac{x_o V_o}{Ft + V_o} + \frac{Y_{x/s} F S_R t}{Ft + V_o}$$

expresión que describe la variación de X con t a lo largo del cultivo alimentado. Puede darse el caso en que el aumento de V sea tal que haya un efecto de dilución que provoque la disminución de la concentración de biomasa. Así, puede ocurrir que la concentración final alcanzada sea menor que la inicial, pero no así la cantidad total $X \cdot V$.

DISEÑO

Se desea obtener una concentración final de biomasa X_f , con un volumen final V_f . El volumen total adicionado durante el BA será:

$$(11) V_f - V_o = F \cdot t$$

donde t_f es el tiempo total de alimentación. Cuando $t = t_f$, la ecuación (8) se transforma en

$$(12) X_f V_f = X_o V_o + Y_{x/s} S_R F \cdot t_f$$

Reemplazando (11) en (12), y despejando S_R queda

$$(13) S_R = \frac{X_f V_f - X_o V_o}{Y_{x/s} (V_f - V_o)}$$

La ecuación (13) permite calcular la concentración de sustrato limitante en el reservorio. Resta calcular F , cuyo valor debe ser tal que satisfaga la ecuación (4). En particular, para $t = 0$ (inicio de la alimentación) será:

$$(14) F S_R \leq \frac{\mu_o X_o V_o}{Y_{x/s}}$$

El valor de t_f se calcula a partir de la ecuación (11).

NOTA: μ_o puede ser igual a μ_{max} si la alimentación se inicia al final de la fase exponencial del batch.

Debe destacarse que si $F \cdot S_R$ fuera mayor que la velocidad de consumo de sustrato, habría una acumulación de sustrato en el medio, y el crecimiento no sería limitado.

Es interesante conocer la variación de μ durante el batch alimentado. Recordando el balance de materia para la biomasa

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu xV \Rightarrow \mu = \frac{1}{xV} \frac{d(xV)}{dt}$$

$$\frac{d(xV)}{dt} = Y_{x/s} F S_R$$

Por lo tanto se obtiene

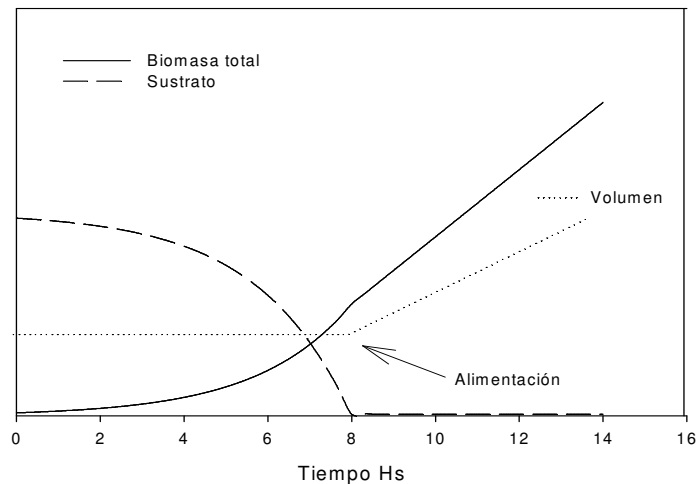
$$(15) \mu = Y_{x/s} F S_R \frac{1}{xV}$$

Si se reemplaza (8) en (15), será

$$(16) \mu = \frac{FS_R Y_{x/s}}{X_o V_o + FS_R Y_{x/s} t}$$

expresión que indica que μ disminuye con t a lo largo del batch alimentado.

Puede representarse un cultivo en batch alimentado operando en las condiciones halladas.



Al obtener valores de S_r y F , se ha DISEÑADO una alimentación para el cultivo en batch alimentado. El caso descrito hasta aquí tiene en cuenta que tanto F como S_r sean constantes. Es claro que en caso de ser $F = F(t)$ y/o $S_r = S_r(t)$, dicha funcionalidad habrá de ser tenida en cuenta para resolver las ecuaciones planteadas.

COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO CELULAR

Los microorganismos requieren energía para mantener ciertas funciones específicas, tales como recambio de material celular, trabajo osmótico, movilidad, entre otros. Esto es decir que aún cuando el crecimiento celular sea nulo ($r_x = 0$) puede observarse cierto consumo de fuente de carbono y energía.

Así, puede escribirse una ecuación para expresar la velocidad de consumo de la fuente de carbono y energía que tenga en cuenta dicho mantenimiento celular

$$(1) r_s = \frac{r_x}{Y'_{x/s}} + m_s x \quad \text{con } r_x = \mu X \quad (2)$$

Esta es la ecuación lineal de consumo de sustrato descrita por Pirt, donde:

m_s : COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO (g sustrato / g biomasa . hora)

$Y'_{x/s}$: rendimiento teórico (rendimiento obtenido si no hubiera consumo de fuente de carbono y energía para mantenimiento)

El valor de $Y'_{x/s}$ es mayor que $Y_{x/s}$, siendo éste el único posible de ser obtenido a partir de datos experimentales.

El coeficiente m_s puede variar en un amplio intervalo (0,01 - 0,1 g/g.h). m_s aumenta con la temperatura, con el aumento de presión osmótica y con la fuerza iónica. Es evidente que se debe tratar de trabajar en condiciones tales que m_s sea bajo si se desea obtener un alto rendimiento en biomasa.

Las ecuaciones que describen un cultivo en batch alimentado pueden adaptarse para el caso en que $m_s \neq 0$ (lo que tal vez sea más real que considerar $m_s = 0$)

El balance de materia para la biomasa será

$$(3) \frac{d(xV)}{dt} = \mu xV$$

y para el sustrato

$$\frac{d(sV)}{dt} = FS_R - r_s V = 0 \quad (4)$$

que se iguala a 0 por ser crecimiento restringido. Reemplazando (1) y (2) en (4) llegamos a

$$(5) \frac{d(SV)}{dt} = F \cdot S_R - \frac{\mu xV}{Y'_{x/s}} - m_s xV = 0$$

Si introducimos (3) en (5), será

$$(6) F \cdot S_R - \frac{1}{Y'_{x/s}} \frac{d(xV)}{dt} - m_s xV = 0$$

y reordenando

$$(7) \frac{d(xV)}{dt} + m_s Y'_{x/s} xV = Y'_{x/s} FS_R$$

Debe notarse que si $m_s = 0$, esta es la expresión de velocidad de acumulación de biomasa para batch alimentado.

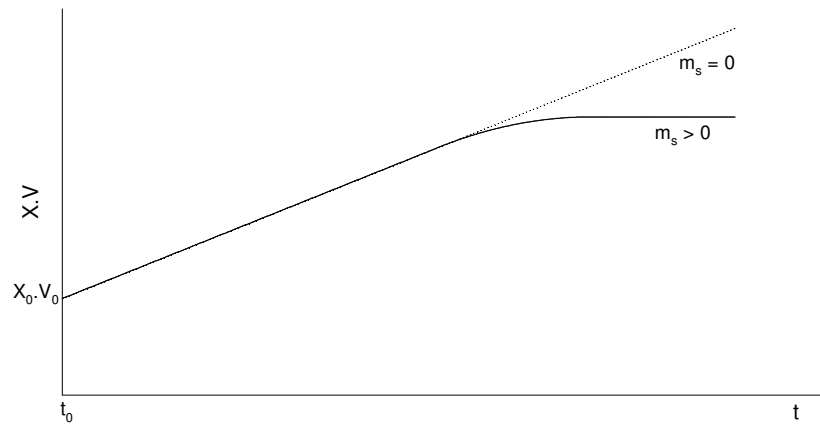
Integrando, con $X = X_0$ y $V = V_0$ para $t = 0$, obtenemos

$$(8) xV = \frac{FS_R}{m_s} + \left(x_0 V_0 - \frac{FS_R}{m_s} \right) e^{-m_s Y'_{x/s} t}$$

(NOTA): para integrar, hacer la sustitución

$$Z = Y'_{x/s} F S_R - m_s Y'_{x/s} xV$$

La variación de $X.V$ con t puede representarse gráficamente



En $(X.V)_{\max} = \text{cte}$, será $d(X.V)/dt = 0$. Por lo tanto, de (7) surge que

$$(X.V)_{\max} = F.S_r / m_s$$

Esto significa que todo el sustrato se utiliza en mantenimiento, y la concentración celular X disminuye, pues hay una gran dilución del sistema. Esto puede analizarse desde el punto de vista de

$$d(X.V)/dt = 0 = r_x.V$$

o sea, $r_x = 0$

Con estas consideraciones puede evaluarse m_s .

De la ecuación (6) surge que

$$(9) m_s = \frac{F.S_R}{xV} - \frac{1}{Y'_{x/s}} \frac{d(xV)}{dt} \frac{1}{xV}$$

Experimentalmente podrán encontrarse tres casos:

a) $X.V = \text{cte}$, lo cual implica que

$$(10) \frac{F.S_R}{xV} = m_s$$

b) Acumulación de biomasa, es decir $d(xV)/dt > 0$. Por lo tanto

$$(11) \frac{F.S_R}{xV} > m_s$$

c) Disminución de la biomasa: $d(xV)/dt < 0$. En este caso será

$$(12) \frac{F \cdot S_R}{xV} < m_s$$

(Este último caso se explica mediante el llamado modelo del metabolismo endógeno)

EL EXPERIMENTO

Se realizará un cultivo en batch alimentado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El medio y las condiciones de cultivo a emplear en el batch previo al comienzo de la alimentación se describen en la guía “Cultivo en batch”.

El diseño de la alimentación se debe realizar de modo tal que sea $x_f = 15$ g/l. El volumen final $V_f = 4.5$ l. Las condiciones al inicio de la alimentación serán: $V_o = 3,5$ l; $S_o = 0$. Se sabe que $\mu_{\max} = 0,40$ h⁻¹ pero que el valor de μ no debe superar el valor de 0,3 ya que por encima de este valor el microorganismo produce etanol y que $Y_{x/s} = 0,45$ g cel/g sustrato.

Con estos datos deben calcularse F , S_r y t_f tales que cumplan con las condiciones impuestas. También pueden evaluarse la evolución de X , de $X.V$ y de μ durante la alimentación.

Las condiciones serán:

Volumen inicial: $V_o = 3,5$ l

Concentración inicial de biomasa: $x_o = a$ determinar en el momento

S_r : 6X del medio de crecimiento

tiempo de alimentación: a determinar en el momento

El protocolo de trabajo es el mismo que el utilizado en el trabajo práctico de Batch.