

TRABAJO PRACTICO CULTIVO BATCH

La conversión microbiológica de carbohidratos para obtener biomasa y productos de interés industrial es tema de constante actualidad debido a la creciente dependencia de los recursos renovables.

Los rendimientos alcanzados en biomasa y productos son de relevancia significativa debido a que, generalmente, el valor de los sustitutos empleados en la formulación de medios de cultivo tiene una importancia sustancial en el costo de operación de las plantas industriales. El grado en que un microorganismo puede transformar los componentes del medio de cultivo en nueva biomasa y productos juega un papel fundamental, a punto tal que puede llegar a ser factor determinante de la viabilidad de un proceso en gran escala. Desde este punto de vista, resulta de sumo interés poder llegar a determinar, estimar o predecir rendimientos que den cuenta de las transformaciones que se están llevando a cabo en un biorreactor. Los balances de materia y energía resultan a tal fin de suma utilidad y su empleo se ha extendido ampliamente en ciencias básicas y aplicadas.

La aparición en el mercado de sensores que permiten medir importantes variables de los cultivos microbianos y el uso de ordenadores acoplados a los biorreactores (biorreactor = recipiente en el cual se cultivan los microorganismos) han ampliado el horizonte para la aplicación de balances de materia y energía. la producción de biomasa (biomasa = concentración de microorganismos expresada en gramos de células secas / litro de cultivo), consumo de las fuentes de C y energía, de nitrógeno y Oxígeno y las producción de CO₂ y desprendimiento de calor son algunas de las variables que pueden ser estimadas a partir de medidas experimentales y utilizadas en el planteo y cálculo de balances de materia y energía.

Antes de proceder a considerar el sistema de análisis propuesto, es conveniente introducir algunas definiciones y hacer ciertas consideraciones sobre algunas “regularidades” observadas experimentalmente en el cultivo de microorganismos.

En primer lugar se ha encontrado que la composición elemental de un importante número de microorganismos, cultivados bajo diferentes condiciones, se mantiene prácticamente constante; así podemos definir un “microorganismo promedio” (composición standard) como aquel cuya composición es (% p/p): C = 46,5; H = 6,94; O = 31,0 y N = 10,85, donde el aproximadamente 5 % restante está representado por sales. Es importante recalcar que si bien la composición elemental promedio de la biomasa se mantiene prácticamente constante, la concentración intracelular de proteínas, RNA y demás constituyentes celulares puede variar sensiblemente entre diferentes especies e incluso entre diferentes estadios del cultivo de un mismo microorganismo.

Teniendo en cuenta esta composición media, podemos escribir lo que sería la “fórmula mínima” de nuestro m.o. promedio como C H_{1,79}O_{0,5}N_{0,2} (en la que está representada el 95% p/p de la biomasa) y con fines netamente prácticos definir “1 C-mol de biomasa” como la cantidad de biomasa que contiene 1 átomo gramo de C. Así pues tenemos que:

$$1 \text{ C - mol de biomasa} = \frac{12 + 1,79 + 16 \times 0,5 + 14 \times 0,2}{0,95} = 25,8 \text{ g}$$

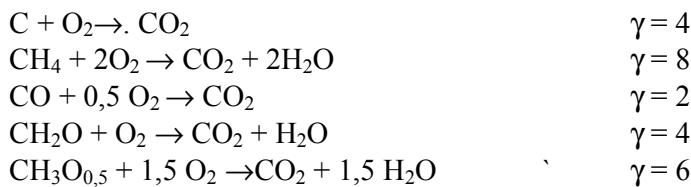
UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Para conocer la cantidad de biomasa que corresponde a n C-moles de biomasa debemos conocer su composición elemental y en base a dicha composición, el peso de 1 cmol. En términos generales la masa resulta ser: $n \cdot P_{\text{cmol g}}$ de biomasa.

De forma análoga a como lo hicimos con la biomasa, podemos definir 1 C-mol de sustrato (entiéndase por sustrato fuente de carbono y energía, **FCE**), 1 C-mol de fuente de N, etc. Como ejemplo, para la glucosa: $C_6H_{12}O_6$, 1 C-mol de glucosa estará representado por CH_2O y pesará 30 g, y para el etanol, 1 C-mol de etanol ($CH_3O_{0,5}$) pesará 23 g.

Otro concepto que debemos introducir es el de “grado de reducción” o “grado de reductancia”, el cual será de gran utilidad en el momento de plantear nuestros balances de materia y energía.

Tomemos como ejemplo las siguientes reacciones de oxidación:

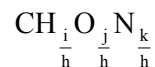


Podemos observar que los distintos valores de γ que figuran a la derecha de cada ecuación coinciden con el número de “electrones disponibles” que fueron transferidos desde el compuesto a oxidar al oxígeno. En general γ se expresa en términos del número de electrones disponibles / c-mol.

Para calcular el valor de γ de un determinado compuesto se toman los grados de reducción 4 para el C; 1 para el H; -2 para el O y -3 para el N. En el caso del CO_2 , H_2O y NH_3 no se tienen e^- disponibles (estados de referencia), luego $\gamma_{CO_2} = \gamma_{H_2O} = \gamma_{NH_3} = 0$. Se considera además que el estado de oxidación predominante del N en la biomasa es -3. En términos generales para un compuesto de fórmula $CH_aO_bN_c$, su grado de reducción vendrá dado por:

$$\gamma = 4 + a - 2b - 3c \quad (1)$$

Si tenemos un compuesto cuya fórmula es $C_h H_i O_j N_k$, debemos llevarlo a la forma



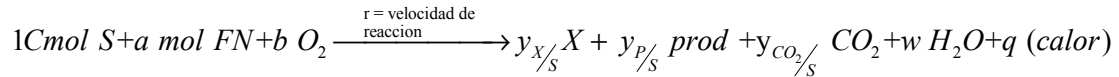
Si tomamos como ejemplo a nuestro m.o. promedio su γ_x (donde el subíndice x indica biomasa) será:

$$\gamma_x = 4,19 \frac{e^- \text{ disp.}}{C - \text{mol}}$$

Este valor, junto a $P_{\text{cmol}} = 25,8$ son dos de las “regularidades” a las que nos habíamos referido con anterioridad. Estos valores pueden ser empleados en balances de materia y energía en aquellos casos en que se desconoce la composición de la biomasa sin temor de incurrir en errores groseros de cálculo. Otras regularidades observadas en el cultivo de m.o. es que el calor de reacción por mol de e^- transferidos al O_2 es relativamente constante para la oxidación de una amplia variedad de moléculas orgánicas y corresponde a 27 Kcal/mol e^- disponibles transferidos al O_2 .

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Estamos ahora en condiciones de plantear una serie de balances de materia y energía, para lo cual trataremos al cultivo de un m.o. como si fuera una reacción química simple.



Donde X significa “biomasa”, cualquiera sea su naturaleza.

Debemos hacer notar que los coeficientes estequiométricos están referidos a 1 C-mol de fuente de C y energía. Así pues:

$$y_x \left[\frac{C\text{-mol de } X}{C\text{-mol de fte. de } C \text{ y } E} \right] \text{ lo mismo para } y_p \text{ e } y_{CO_2}.$$

El balance de carbono para esta reacción de formación de biomasa y producto será:

$$y_{X/S} + y_{P/S} + y_{CO_2/S} = 1 \quad (2)$$

De igual forma podemos establecer un balance del grado de reducción:

$$\gamma_s + (-4)b = y_x \cdot \gamma_x + y_p \cdot \gamma_p \quad (3)$$

Reordenando y dividiendo por γ_s obtenemos

$$\frac{4b}{\gamma_s} + \frac{y_x \cdot \gamma_x}{\gamma_s} + \frac{y_p \cdot \gamma_p}{\gamma_s} = 1 \quad (4)$$

o lo que es lo mismo

$$\varepsilon + \eta + \xi = 1 \quad (5)$$

donde $\varepsilon = \frac{4b}{\gamma_s}$ (fracción de e^- disponibles de la FCE transferidos al O_2)

$\eta = \frac{y_x \cdot \gamma_x}{\gamma_s}$ (fracción de e^- disp. de la FCE transferidos a la biomasa)

$\xi = \frac{y_p \cdot \gamma_p}{\gamma_s}$ (fracción de e^- disp. de la FCE transferidos al producto)

Estos dos balances obedecen directamente al principio de conservación de la masa y la energía, en el primero de ellos, no puede haber entre los productos más carbono del que un c-mol de sustrato puede aportar y el en el caso del segundo, los electrones disponibles del sustrato deben ir obligadamente a los distintos productos.

Si asumimos, como ya se mencionó, que el calor de reacción por mol de e^- disponibles transferidos al oxígeno es constante para un importante número de moléculas orgánicas, el

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

primer término de la ecuación (4) nos da la fracción de energía del sustrato que evoluciona como calor. Si llamamos q_0 a esa constante con $q_0 = 27$ Kcal/mol e⁻ disponibles transferidos al O₂, el calor generado en la ecuación 1' vendrá dado por:

$$q = 4 q_0 b \text{ kcal/C-mol de sustrato} \quad (6)$$

Si conocemos la velocidad de consumo de O₂ de nuestro cultivo podemos calcular la velocidad de producción de calor y por lo tanto los requerimientos de H₂O de enfriamiento para mantener constante la temperatura de nuestro biorreactor.

El concepto de e⁻ disponibles nos brinda un método simple de cálculo para chequear los resultados obtenidos experimentalmente en lo que se da en llamar “análisis de consistencia interna”. Empleando las ecuaciones (2) y (4) o (5) con datos obtenidos en el laboratorio, podemos estimar parámetros no medidos y tener idea de cuán confiables fueron nuestras determinaciones. Medidas realizadas en el laboratorio deben encontrarse dentro de los intervalos:

$$0,94 \leq y_x + y_p + y_{CO_2} \leq 1,06$$

$$0,93 \leq \eta + \varepsilon + \xi \leq 1,07$$

Valores inferiores o superiores a estos límites de aceptabilidad determinados estadísticamente ponen en evidencia errores en las determinaciones experimentales.

En el trabajo habitual de laboratorio la cuantificación de la biomasa producida se efectúa gravimétricamente, es decir, se determina el incremento en biomasa expresado en g/l (Δx) correspondiente a la utilización de una determinada cantidad de sustrato (Δs) (igualmente expresada en g/l) con lo cual definimos nuestro rendimiento en base a sustrato como

$Y_x = -\frac{\Delta x}{\Delta s}$ al que tomamos como “rendimiento global” en el que sólo se tienen en cuenta los valores finales e iniciales de biomasa y sustrato, más rigurosamente Y_x debiera ser expresado por el límite $\Delta x / \Delta s$ con $\Delta s \rightarrow 0$, esto es: $Y_x = -\frac{dx}{ds}$ (observar que el signo negativo es introducido porque x y s varían en sentido contrario).

Estamos ahora en condiciones de calcular los valores de y_x , y_p , y y_{CO_2} conociendo los respectivos rendimientos globales y los valores de P cmol de X, S, P y CO₂ tal cual vemos a

$$\text{continuación: } y_x = Y_x \frac{P \text{ cmol } S}{P \text{ cmol } X} ; \quad y_p = Y_p \frac{P \text{ cmol } S}{P \text{ cmol } P} ; \quad y_{CO_2} = Y_{CO_2} \frac{P \text{ cmol } S}{PM \text{ } CO_2} \quad (7)$$

Resulta de gran interés conocer los destinos que toma la fuente de C y energía durante el crecimiento microbiano y la fracción de la misma empleada por el m.o. para obtener la energía necesaria para llevar adelante sus funciones metabólicas.

Por balance de sustrato:

$$\Delta S = \Delta S_x + \Delta S_p + \Delta S_E \quad (8)$$

donde

ΔS = Sustrato total consumido

ΔS_x = Fracción de sustrato utilizado en la formación de biomasa

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

ΔS_p = Fracción de sustrato utilizado en la formación de producto

ΔS_E = Fracción de sustrato utilizado para obtener energía

por consiguiente:

$$\Delta S_E = \Delta S - \Delta S_x - \Delta S_p$$

$$\Delta S_E = \Delta S + \Delta X \cdot \frac{P \text{ cmol } S}{P \text{ cmol } X} + \Delta P \cdot \frac{P \text{ cmol } S}{P \text{ cmol } P}$$

$$f_E = 1 - y_x - y_p = y_{CO_2} \quad f_E : \text{fracc. de FCE destinada a la obtención de E.} \quad (11)$$

Experimentalmente lo que se hace es determinar la producción global de CO_2 y conociendo la masa de CO_2 y sustrato consumido y calcular ΔS_E por estequiometría. Este método presenta dos inconvenientes: en primer lugar existen reacciones enzimáticas que incorporan O_2 a determinados componentes celulares (O_2 que no es empleado para obtener energía) no obstante este consumo puede ser despreciado frente al global para oxidar la fte. de C y E; y el más importante es que debemos suponer que $\gamma_x \cong \gamma_s$, caso contrario se introduce un grosero error en el cálculo.

Cinética de crecimiento

Hasta aquí hemos visto las relaciones estequiométricas que existen en los cultivos microbianos, y cómo a través de ellas es posible obtener información del destino que tiene la fuente de carbono y energía. Las ecuaciones (2) y (4), resumen toda la información que es posible obtener mediante los balances de materia y energía, pero nada dicen acerca de la velocidad, r , con que transcurre el proceso; por lo que ahora centraremos la atención en este aspecto.

Convendrá antes definir la forma en que expresaremos las distintas velocidades. De este modo llamaremos a:

$r_x = \frac{dx}{dt}$; velocidad de crecimiento microbiano (o, brevemente, velocidad de crecimiento) y

las unidades serán: $\frac{\text{Cmol biomasa}}{\text{L} \cdot \text{h}}$

del mismo modo:

$r_s = \frac{ds}{dt} \left(\frac{\text{Cmol FCE}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$ = velocidad de consumo de sustrato

$r_p = \frac{dp}{dt} \left(\frac{\text{Cmol de producto}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$ = velocidad de formación de producto.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

$$r_{O_2} = \frac{-d_{O_2}}{dt} \left(\frac{\text{mol } O_2}{L \cdot h} \right) = \text{velocidad de consumo de } O_2$$

$$r_{CO_2} = \frac{d_{CO_2}}{dt} \left(\frac{\text{mol } CO_2}{L \cdot h} \right) = \text{velocidad de producción de } CO_2$$

Estas velocidades también pueden ser expresadas en $\frac{g}{L \cdot h}$; y en este caso, para diferenciarlo del anterior, las denotaremos con R. Por ej.:

$$R_x = \frac{dx}{dt}; \frac{\text{gramos de biomasa}}{L \cdot h}$$

Análogamente tendremos: R_s, R_{O_2} , etc.

La conversión entre r_x y R_x estará dada por:

$$R_x = 25,8 \cdot r_x$$

Análogamente:

$$R_s = \frac{g \text{ de S}}{c \text{ mol de S}} \cdot r_s$$

$$R_{O_2} = 32 \cdot r_{O_2}, \text{ etc.}$$

Velocidades específicas:

Corresponden a las anteriormente definidas pero referidas a la unidad de biomasa, es decir:

$$\frac{r_x}{x} = \mu; \text{ velocidad específica de crecimiento.}$$

$$\frac{r_s}{x} = q_s; \text{ velocidad específica de consumo de sustrato (s puede ser la fuente de carbono y energía o cualquier otro componente del medio)}$$

$$\frac{r_{O_2}}{x} = q_{O_2}; \text{ velocidad específica de consumo de } O_2.$$

$$\frac{r_p}{x} = q_p; \text{ velocidad específica de formación de producto.}$$

etc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Las velocidades específicas suelen brindar información acerca de cuál es la actividad metabólica del microorganismo (o de la biomasa) durante el cultivo, ya que el estar referidos a la unidad de biomasa cualquier modificación en el valor de μ , q_s , etc. estará indicando que "algo" está ocurriendo en el metabolismo del microorganismo en cuestión.

De hecho es frecuente que las velocidades específicas varíen durante el cultivo, y es muy común que por ej. el valor de μ al principio del cultivo difiera del que se encuentra en estadios posteriores. Lo mismo vale para q_s , q_{O_2} , etc.

Curva de crecimiento

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, estos comienzan a multiplicarse a expensas de los nutrientes hasta que, finalmente, el crecimiento se detiene por agotamiento de alguno de los componentes del medio de cultivo (sustrato limitante) o bien por acumulación de inhibidores. Un cultivo de esta naturaleza, en el cual una cierta cantidad de microorganismos es sembrada en un volumen dado de medio de cultivo, se conoce como Cultivo en batch, su empleo es muy frecuente pero no es el único, ya que existen otros métodos para cultivar microorganismos, por ej. el Batch alimentado y el Cultivo continuo.

Cultivo en Batch

La evolución del cultivo en el tiempo, sigue una curva típica la cual recibe el nombre de "curva de crecimiento en batch". Los sucesos que tienen lugar durante la misma pueden separarse en cuatro fases perfectamente diferenciables. En primer lugar existe una fase donde prácticamente no hay división celular pero sí aumento de la masa individual de los microorganismos (fase "lag" o fase de retardo). Le sigue una etapa donde el crecimiento ocurre a velocidad específica (μ) máxima y constante = μ_m (fase exponencial). Al final de esta fase se alcanza la máxima concentración microbiana. Posteriormente hay un rápido período de desaceleración donde $\mu \rightarrow 0$ y se entra en la fase estacionaria la cual es causada por agotamiento de algún nutriente (el sustrato limitante) o bien por acumulación de inhibidores. Durante esta fase la concentración microbiana (o de biomasa) permanece constante. Finalmente se llega a una última etapa donde la concentración de biomasa disminuye por autólisis o como consecuencia del metabolismo endógeno (fase de decaimiento).

La duración de cada una de estas fases es función del microorganismo en estudio y de la composición del medio de cultivo. En particular la fase lag depende además de la fase de crecimiento en que se encuentran las células en el momento de ser sembradas y de la composición del medio de cultivo en que fueron crecidas. Si éste es igual a la composición del medio en que se van a sembrar y las células están en fase exponencial, la duración de la fase lag, en general se acorta y puede llegar a desaparecer, lo cual es deseable ya que constituye tiempo perdido.

La descripción matemática (modelado) de las cuatro fases descriptas es sumamente compleja y escapa a los fines de esta guía, por lo que sólo veremos una más simple que sólo contempla la fase exponencial y la estacionaria.

De la definición de μ obtenemos

$$r_x = \mu \cdot x \quad (12)$$

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

donde x = concentración de biomasa. Hemos visto que μ varía durante el cultivo, siendo un valor constante y máximo en la fase exponencial (μ_m) y nulo en la estacionaria. Monod ha propuesto una relación muy simple entre el valor de μ y la concentración de sustrato limitante, S , entendiéndose por éste al componente del medio de cultivo que esté en menor proporción respecto de las necesidades del microorganismo. Por tanto S puede ser la fuente de N, de C, algún aminoácido, etc. La ecuación es:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (13)$$

A K_S se la conoce como Constante de Saturación, y da una idea de la afinidad que tiene el microorganismo por el sustrato en cuestión. A menor K_S mayor afinidad. Normalmente K_S tiene valores muy pequeños (10^{-2} - 10^{-3} g/l) por lo que concentraciones relativamente pequeñas de S son suficientes para hacer que:

$$\mu = \mu_m \quad (14)$$

Reemplazando la ec. (13) en (12) queda:

$$r_x = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \cdot x \quad (15)$$

Al principio del cultivo todos los nutrientes estarán en exceso, y en particular el sustrato limitante también, por lo que la ex. (15) se reduce a (fase exponencial)

$$r_x = \mu_m x ; \text{ o bien: } \frac{dx}{dt} = \mu_m \cdot x \quad (16)$$

La ec. (16) es fácilmente integrable y si hacemos a $t = 0$; $x = x_0$ (concentración inicial de microorganismos) queda:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m t \quad (17)$$

o bien

$$x = x_0 e^{\mu_m t} \quad (18)$$

Por tanto en esta fase la concentración de biomasa aumenta exponencialmente, y también lo hace r_x ya que reemplazando: $r_x = \mu_m x_0 e^{\mu_m t}$

A partir de la ec. (17) se puede calcular el tiempo de generación del microorganismo (período de tiempo en que la biomasa se duplica) haciendo $x = 2 x_0$ y nos queda $t_g = \frac{\ln 2}{\mu_m}$

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

A medida que transcurre el tiempo de cultivo, S va disminuyendo (y por tanto r_x) hasta que finalmente $S = 0$ (fase estacionaria), y

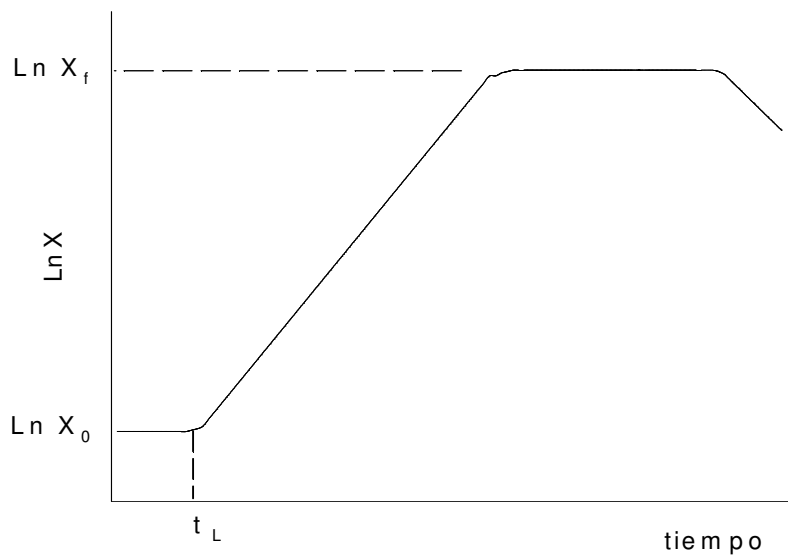
$$r_x = 0 \quad (19)$$

lo que implica:

$$x = \text{cte} = x_f \quad (20)$$

x_f = concentración final de biomasa.

Si graficamos $\ln x$ vs. t se obtiene un gráfico como el de la fig.



De la fase exponencial se calcula μ_m mediante la ecuación (17). La duración de la fase lag, t_L , se puede calcular del gráfico, o bien haciendo una corrección en la ec. (17).

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_m (t - t_L)$$

Si tomamos un valor cualquiera de x que corresponda a la fase exponencial, x_e , podemos calcular t_L .

$$t_L = t_e - \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{x_e}{x_0}$$

Consumo de Sustrato

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Hemos visto que el rendimiento se definía como $y_x = -\frac{dx}{ds} = -\frac{dx/dt}{ds/dt} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{\mu}{q_s}$

por tanto

$$r_s = \frac{r_x}{y_x} \quad (22)$$

reemplazando en la ec. (22) la ec. (15) queda:

$$r_s = \frac{\mu_m}{y_x} \cdot \frac{S}{k_s + S} \cdot x \quad (23)$$

A medida que S tiende a cero, r_s también.

En fase exponencial será $S \gg k_s$ y además x estará dado por la ec. (18), por tanto:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{\mu_m x_0 e^{\mu_m t}}{y_x} \quad (24)$$

Si a $t = 0$ es $S = S_0$ implica:

$$S = S_0 - \frac{x_0}{y_x} (e^{\mu_m t} - 1) \quad (25)$$

La ec. (25) da la variación de S en función de t durante la fase exponencial.

Si se conoce de antemano el rendimiento y_x (o Y_x) y las concentraciones iniciales de sustrato y biomasa, es fácil estimar el valor de x_f ya que:

$$\Delta x = -Y_x \cdot \Delta S \quad (26)$$

$$x - x_0 = Y_x (S - S_0) \quad (27)$$

Si S es el sustrato limitante, se tendrá que para $x = x_f$ será $S_f = 0$, por tanto:

$$x_f = x_0 + Y_x \cdot S_0 \quad (28)$$

La ec. (27) permite calcular S para un x dado (o viceversa) en cualquier parte de la curva de crecimiento, siempre y cuando Y_x (o y_x) se mantenga constante. Alternativamente la ec. (27) puede emplearse para verificar si tal supuesto se cumple ya que la gráfica de $(x - x_0)$ en función de $(S_0 - S)$ deberá ajustarse a una recta. De todos modos siempre es posible calcular un rendimiento global, independientemente de las variaciones que pueda tener durante el cultivo, empleando sólo valores iniciales y finales:

$$Y_x = - \frac{(x_f - x_o)}{(S_f - S_o)} \quad (29)$$

Consumo de O₂

Hemos visto que realizando un balance entre la composición de los gases que ingresan y salen del biorreactor se puede calcular r_{O_2} . Con este valor y el de la concentración de biomasa, x , se puede calcular a distintos tiempos el valor de $q_{O_2} = \frac{r_{O_2}}{x}$, con lo cual tendremos una idea de lo que ocurre con la capacidad respiratoria de los microorganismos durante el cultivo. Al respecto es útil estudiar cuáles son las posibles causas de variación de q_{O_2} .

1) Sea $y_{x/o} = \frac{\Delta x}{\int_0^t r_{O_2} dt}$ (30) $y_{x/o}$ = rendimiento de biomasa base a O₂ consumido

Al igual que en la ec. (21) podemos hacer:

$$y_{x/o} = \frac{r_x}{r_{O_2}} = \frac{\mu}{q_{O_2}} \quad (31)$$

de donde reemplazando μ por la ec. (13)

$$q_{O_2} = \frac{\mu_m}{y_{x/o}} \frac{S}{k_s + S} \quad (32)$$

En fase exponencial es $S \gg k_s$ y \therefore

$$q_{O_2} = \frac{\mu_m}{y_{x/o}} = q_{O_2,m} \quad (33)$$

es decir que en esta fase q_{O_2} se mantiene constante y con un valor máximo. A medida que S disminuye, q_{O_2} también hasta que virtualmente se hace nulo en la fase estacionaria. Esto es particularmente válido cuando el sustrato limitante es la fuente de carbono y energía, ya que al agotarse ésta, los microorganismos se quedan sin “combustible” y por tanto el consumo de O₂ cesa. No ocurre lo mismo cuando el sustrato limitante es por ej. la fuente de nitrógeno, pues si bien cuando ésta se agote se detendrá el crecimiento, nada impide que los microorganismos sigan respirando ya que cuentan con “combustible” en exceso.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

2) Otra causa que afecta el valor de q_{O_2} es la concentración de O_2 disuelto. Por analogía con la ecuación de Monod, se ha propuesto la ecuación:

$$q_{O_2} = q_{O_2,m} \frac{C}{k_o + C} \quad (34)$$

donde C = concentración de O_2 disuelto.

Al igual que k_s , se encuentra que k_o es pequeño, y en general valores de C del orden de 0,8 mg/l (10% de saturación) son normalmente suficientes para que $q_{O_2} = q_{O_2,m}$. A la concentración de O_2 disuelto por encima de la cual el valor de q_{O_2} se mantiene constante, se la conoce como concentración crítica (C_c).

PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*.

Medio de cultivo:

Glucosa	10,00	g/l
Urea	1,50	g/l
K ₂ HPO ₄	1,00	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,60	g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,10	g/l
ácido cítrico	0,45	g/l
H ₃ BO ₃	0,10	mg/l
CuSO ₄	0,10	mg/l
KI	0,10	mg/l
FeCl ₃	0,10	mg/l
Na ₂ MoO ₄	0,10	mg/l
inositol	6,00	µg/l
biotina	6,00	µg/l
ácido fólico	6,00	µg/l
pantotenato de calcio	0,80	mg/l
tiamina	0,80	mg/l
ácido nicotínico	0,80	mg/l
ácido p-amino benzoico	0,40	mg/l
riboflavina	0,40	mg/l
piridoxina	1,60	mg/l
antiespumante	3 gotas	

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

pH 5,50 (ajustado con HCl o H₂SO₄ 1N)
Volumen de cultivo: 4,0 l

Los fosfatos se esterilizan por calor húmedo (autoclave), fraccionados en un erlenmeyer con salida lateral, disolviendo la cantidad necesaria para preparar 3,6 l de medio de cultivo, en 500 ml de H₂O y se ajusta el pH en 5,50. El resto de los componentes (excepto la urea y la solución de vitaminas) se disuelven en 3,1 l. de H₂O y se ajusta el pH en 5,50. Los microelementos se agregan en solución concentrada 1000 veces a razón de 1 ml/l, se ajusta el pH en 5,50 y se esterilizan, en autoclave, en el biorreactor.

El tiempo de esterilización será en ambos casos de 15 minutos. La urea se esteriliza por filtración. Se prepara una solución madre con 500 g/l de urea y se esteriliza con membrana absoluta. Esta solución se adiciona en proporción de 6,0 ml por litro de medio de cultivo.

Las vitaminas se preparan en solución concentrada 1000 veces, se esterilizan por filtración y se adicionan a razón de 1 ml/l de medio.

Inóculo: Dos erlenmeyers de 1000 ml conteniendo 200 ml de medio de cultivo diluido 2,5 veces se esterilizan por calor durante 10 min. En este caso para mayor simplicidad se esterilizará el medio de cultivo completo (excepto la urea y las vitaminas que se adicionarán en proporción de 0,5 ml y de 0,1 ml de las soluciones madres). Los erlenmeyers serán sembrados el día anterior a la realización de trabajo práctico con células de levaduras provenientes de un cultivo en agar inclinado. Las mismas se resuspenden fácilmente en agua. La temperatura de incubación será en todos los casos de 30°C.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Termostatar el biorreactor a 30°C
- 2.- Conectar el sistema de aireación al filtro estéril del biorreactor.
- 3.- Conectar el sistema de agitación del biorreactor. Fijar la agitación en 600 rpm.
- 4.- Adicionar en forma estéril los fosfatos, la urea y las vitaminas al resto del medio de cultivo contenido en el biorreactor.
- 5.- Calibrar el electrodo para medir O₂ disuelto haciendo pasar por el biorreactor, primero una corriente de nitrógeno y ajustando la lectura a 0% de saturación (ajuste del cero) y luego aire a un caudal de 1,5 l/min., ajustando con la perilla de calibración a 100% de saturación. En ambos casos, antes de realizar los ajustes, se debe dejar transcurrir 10 a 15 minutos. Los gases que ingresen al biorreactor deberán pasar por el filtro estéril.
- 6.- Calibrar los instrumentos de medida para efectuar el análisis de los gases a la salida del biorreactor (analizador de O₂ y de CO₂).
- 7.- Trasvasar, en forma estéril, los tres erlenmeyers de inóculo a otro con salida lateral.
- 8.- Sembrar el biorreactor y aguardar 2 a 3 minutos
- 9.- Tomar 15 mL de muestra (descartar antes 2 o 3 mL) y tomar el tiempo CERO. Anotar en cada caso el volumen de muestra y el de descarte.
- 10.- Medir el porcentaje de O₂ y CO₂ en los gases de salida del biorreactor

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES
Departamento de Ciencia y Tecnología
Bioprocesos I

Análisis de las muestras

- 11.- 10 mL se centrifugan 10 minutos. Guardar el sobrenadante para determinar concentración de FCE y producto. Lavar (una vez) con agua destilada el pellet de levaduras, centrifugar, resuspender las células con más agua destilada y hacer peso seco a 105°C.
- 12.- Al resto de la muestra medirle:
 - 12.1.- pH
 - 12.2.- DO a 600nm. La muestra deberá diluirse de forma tal de obtener lecturas entre 0,2 y 0,6.
- 13.- Repetir los pasos 9 a 12 cada hora.
- 14.- Finalizado el cultivo, medir el volumen remanente. Con este dato y los de volumen de muestra y lavado calcular el volumen de cultivo a la hora CERO, 1; 2, 3; etc. El volumen obtenido en cada caso será el utilizado para el cálculo de r_{O_2} y r_{CO_2} a los correspondientes tiempos.

Resultados

Los datos se volcarán en una tabla del siguiente formato y luego se harán las graficas correspondientes en función del tiempo

Hora	T	pH	DO ₆₀₀	X	S	r_{O_2}	r_{CO_2}	C.R.
------	---	----	-------------------	---	---	-----------	------------	------

- I.- Graficar $\ln x$ vs. t. y DO vs. t. Calcular R_{max} .
- II.-1 Verificar si $Y_{X/S}$ se mantuvo constante durante el cultivo.
- II.-2 Calcular $Y_{X/S}$ e $y_{X/S}$ globales.
- II.-3 Calcular el consumo global de O_2 y el CO_2 total producido. Con estos valores calcular b e $y_{CO_2/S}$ respectivamente.
- III.- Verificar si se cumplen los balances de carbono y de grado de reducción.

$$\varepsilon + \eta + \xi = 1$$
$$y_{X/S} + y_{CO_2/S} = 1$$