

Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno en microorganismos incluyendo el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno

Determination of the specific oxygen uptake rate in microorganisms including electrode time response

Ana María Torres López ^{a*}, Juan Carlos Quintero Díaz ^b,
Lucía Atehortúa Garcés ^c

^aPrograma de Bioingeniería. Calle 67 N° 53-108, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia

^bGrupo de Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química. Calle 67 N° 53-108 Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia

^cGrupo de Biotecnología Vegetal. Instituto de Biología. Calle 67 N° 53-108 Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia

(Recibido el 6 de agosto de 2007. Aceptado el 9 de noviembre de 2007)

Resumen

La transferencia de oxígeno es un parámetro importante en los procesos de fermentación aerobios. Conocer el consumo de oxígeno real del organismo de interés, permite determinar los requerimientos energéticos y de proceso en aireación y agitación. En este trabajo se presenta un tratamiento matemático y metodológico para la determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2) considerando el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno. Dicha metodología se aplicó en la determinación del QO_2 del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, durante su cultivo en un reactor de tanque agitado a escala de laboratorio. Se obtuvo un valor promedio de QO_2 de 0,345 mmol O_2 (g biomasa.h)⁻¹ ± 0,0171 sin incluir el tiempo de respuesta del electrodo y de 0,383 mmol O_2 (g biomasa.h)⁻¹ ± 0,025 al incluir dicho parámetro. A mayor tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno, mayor será la diferencia entre los valores de QO_2 .

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 + 219 55 08, fax: + 57 + 4 + 211 90 28, correo electrónico: atorres@udea.edu.co (A. Torres)

----- *Palabras clave:* demanda específica de consumo de oxígeno, electrodo de oxígeno disuelto, tiempo de respuesta, *Ganoderma lucidum*.

Abstract

The oxygen transfer rate is an important parameter for the aerobic fermentative process. By establishing the real oxygen uptake rate of the target organism we can determine the energetic and process requirements for aeration and agitation. We report in this paper the mathematical and methodological procedure for the determination of the specific oxygen uptake rate (QO_2), taking the oxygen electrode response into account. This methodology was applied to the QO_2 determination for the *Ganoderma lucidum* medicinal mushroom while it was being cultured in a stirred reactor in the laboratory. The average value for QO_2 was $0.345 \text{ mmol O}_2 (\text{g biomass.h})^{-1} \pm 0.0171$ without taking the electrode time response into account and $0.383 \text{ mmol O}_2 (\text{g biomass.h})^{-1} \pm 0.025$ taking the electrode time response into account. Higher response times of the oxygen electrode resulted in a greater differences between the two QO_2 values obtained.

----- *Keywords:* specific oxygen transfer rate, oxygen electrode, time response, *Ganoderma lucidum*.

Introducción

En los procesos de fermentación aeróbica es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los organismos empleados. La oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO_2 establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aireación y mezclado del cultivo, el oxígeno es el receptor final de los electrones producidos en las reacciones de oxidación, fenómeno conocido como respiración aerobia [1, 2].

Comúnmente el oxígeno se introduce en el caldo de cultivo por la inyección de aire, las moléculas de oxígeno deben superar una serie de resistencias al transporte antes de que sean utilizadas por las células. En la figura 1 se muestran de forma esquemática las resistencias involucradas en el transporte de oxígeno desde el interior de las burbujas de gas hasta el lugar de reacción en el interior de las células [3].

La velocidad a la que las células consumen oxígeno en los biorreactores determina la velocidad a la que se requiere transferir. Muchos factores influyen en la demanda de oxígeno, siendo los más importantes la especie celular utilizada, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio.

En cultivos discontinuos, la velocidad de consumo de oxígeno varía con el tiempo, debido a que la concentración de células aumenta durante el cultivo y a los cambios fisiológicos en las diferentes fases de crecimiento. De otro lado, cuando la concentración de oxígeno disuelto en el líquido (C_L), se sitúa por debajo de un cierto nivel crítico ($C_{crit.}$), la velocidad específica de consumo de oxígeno dependerá también de C_L . Para eliminar las limitaciones en el crecimiento por falta de oxígeno, C_L en cada punto del biorreactor debe ser superior a $C_{crit.}$

La C_L en biorreactores se mide generalmente empleando un electrodo de oxígeno disuelto. Existen dos tipos de electrodos que son de uso común: los electrodos galvánicos y los polarográficos. Los

electrodos están constituidos por una carcasa metálica que contiene un cátodo de Pt y un ánodo de Ag, inmersos en una solución electrolítica. Esta celda está separada del medio por una membrana permeable al oxígeno. Las reacciones que tienen lugar en el electrodo son:

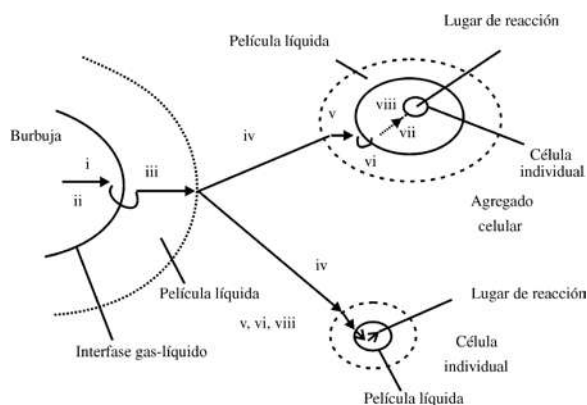
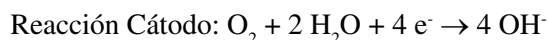
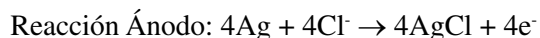


Figura 1 Representación de las resistencias a la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire hasta el interior de la célula en células libres y agregados celulares. (i) Difusión desde la fase gaseosa de la burbuja hasta la interfase, (ii) Disolución del oxígeno a través de la interfase gas-líquido, (iii) Difusión a través de una película líquida estancada que rodea la burbuja, (iv) Transporte convectivo del oxígeno a través del seno del fluido, (v) Difusión a través de una película líquida estancada que rodea la célula o los agregados, (vi) Difusión libre a través de la interfase líquido-célula o líquido-agregado, (vii) Difusión a través del agregado hasta cada célula individual y (viii) Difusión libre a través del citoplasma al interior de la célula

Estas reacciones químicas producen una corriente eléctrica que es proporcional a C_L . Puesto que no existe movimiento del fluido en la solución electrolítica y escaso movimiento en la película líquida que rodea la membrana, se considera que el oxígeno se transfiere desde el medio hacia el

electrodo por difusión molecular y como consecuencia, existe un retraso en la respuesta del electrodo con respecto al valor real en el medio. El tiempo de respuesta se define como el tiempo que tarda el electrodo en alcanzar el 63% del valor final de la medida, cuando se lo expone a un cambio de concentración [3]. En caso de que no se tuviera en cuenta la corrección por el retraso en la respuesta del electrodo de oxígeno, sobre los valores de OD suministrados, se podría sub-

valorar el valor del QO_2 y en consecuencia operar el biorreactor bajo unas condiciones de aireación y/o agitación no adecuadas para el crecimiento del microorganismo.

En la tabla 1 se presentan datos de QO_2 reportados en la literatura. En algunos de estos reportes bibliográficos no se especifica si los datos de concentración de oxígeno, necesarios para la determinación de dicho parámetro, fueron corregidos considerando el tiempo de respuesta del electrodo.

Tabla 1 Velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2) para diferentes microorganismos

<i>Organismo</i>	QO_2 (mmol O_2 .g células ⁻¹ .h ⁻¹)	<i>Ref.</i>
Bacillus thuringiensis	5,13 (sin corregir) 0,79 (corregido)	[4]
Cephalosporium acremonium	1,06	[5]
Pseudomonas putida	18,00 (sin corregir)	[6]
Candida lipolytica	0,81	[7]

La información respecto a la metodología para la determinación del QO_2 teniendo en cuenta el tiempo de respuesta del electrodo es escasa [2, 8]. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo es presentar en forma detallada el procedimiento matemático para la determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno QO_2 considerando el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno; adicionalmente se presenta la aplicación de dicho procedimiento en la determinación del QO_2 para el hongo medicinal *Ganoderma lucidum* cultivado en un biorreactor de tanque agitado.

Modelo matemático

A continuación se presenta el modelo para el cálculo del QO_2 considerando el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno.

La ecuación (1) describe el balance de oxígeno durante la transferencia desde una burbuja de aire hacia el medio de cultivo y el consumo por la célula:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a(C^* - C_L) - QO_2 X \quad (1)$$

Donde

$K_L a$: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h⁻¹)

C^* : solubilidad del oxígeno en el medio (gL⁻¹)

C_L : concentración de oxígeno disuelto en el medio (gL⁻¹)

QO_2 : velocidad específica de consumo de oxígeno (mmol O_2 .g células secas⁻¹. h⁻¹)

X : concentración de células secas en el medio (g.L⁻¹)

Al dividir ambos lados de la ecuación (1) por C^* , se tiene:

$$\frac{d(C_L / C^*)}{dt} = K_L a \left(1 - \frac{C_L}{C^*} \right) - R \quad (2)$$

Donde $R = \frac{Q_2 X}{C^*}$

Durante la medición del QO_2 se suspende la aireación, por tanto la ecuación (4) se simplifica así:

$$\frac{d(C_L / C^*)}{dt} = -R \quad (3)$$

La ecuación (3) puede integrarse con la condición inicial $C_L(0)=C_b$. Donde C_b es la concentración de oxígeno disuelto en condición de estado estable, al iniciarse la medición de QO_2 (figura 2). Considerando que el valor de QO_2 es constante, dado que el tiempo en el que se hace la medición es corto,

$$\frac{C_L}{C^*} = \frac{C_b}{C^*} - Rt = U + Vt \quad (4)$$

Donde

$$U = \frac{C_b}{C^*}$$

$$V = -R$$

Por consiguiente, durante la etapa de medición del QO_2 , el descenso en la concentración de oxígeno disuelto es lineal con respecto al tiempo (figura 2).

Para incluir el efecto de la respuesta del electrodo en las mediciones experimentales, Yang *et al.* [9] presentaron una expresión (ver ecuación 5) que muestra la relación entre la señal con retraso del electrodo $E(t)$ y la señal sin retraso $E'(t-T)$, que incluye el tiempo muerto del electrodo (T), por la introducción de una función de transferencia.

$$E'(t-T) = E(t) + \frac{1}{k} \left(\frac{dE(t)}{dt} \right) \quad t \geq T \quad (5)$$

Donde:

T: tiempo muerto del electrodo

k: inverso del tiempo de respuesta, $k = \frac{1}{\tau}$

De la ecuación (4), si se define que $E'(t) = \frac{C_L}{C^*}$, entonces:

$$E'(t) = U + Vt, \text{ y}$$

$$E'(t-T) = U + V(t-T) \quad (6)$$

Multiplicando la ecuación (5) y (6) por k e igualando ambas ecuaciones, resulta:

$$\frac{dE(t)}{dt} + kE(t) = k[U + V(t-T)] \quad (7)$$

La ecuación (7) es una ecuación diferencial lineal de primer orden y su solución es de la forma:

$$E(t) = U - VT + V \left(t - \frac{1}{k} \right) + be^{-kt}, \quad t \geq T \quad (8)$$

Dado que $E(T)=E'(0)=U$, entonces

$$b = \frac{V}{k} e^{kT} \quad (9)$$

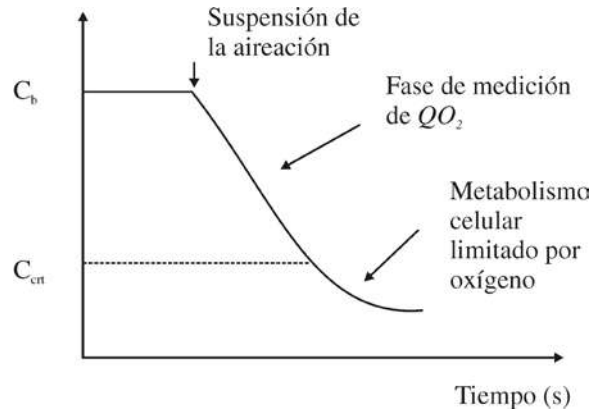


Figura 2 Variación de la concentración de oxígeno disuelto para medidas de QO_2

Por consiguiente, la respuesta dinámica del electrodo de oxígeno durante el tiempo de medición del QO_2 es:

$$E(t) = U - VT + Vt - \frac{V}{k} (1 - e^{-k(t-T)}) \quad (10)$$

Para elementos de medición sin tiempo muerto ($T=0$), esta ecuación se simplifica a:

$$E(t) = U + V \left[t - \frac{1}{k} (1 - e^{-kt}) \right] \quad (11)$$

Como el electrodo empleado no presenta tiempo muerto, se empleó la ecuación (11) en la determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2), considerando el tiempo de respuesta del electrodo. Luego, a partir de la gráfica

de $E(t)$ vs. $\left[t - \frac{1}{k}(1 - e^{-kt}) \right]$ se encontró el valor de V , del cual se derivó el valor del QO_2 .

Experimentación

Microorganismo y cultivos de activación

La cepa de *Ganoderma lucidum* se conservó a 4°C en cajas Petri conteniendo agar enriquecido con cereales. El preinóculo de 100 mL, se preparó en erlenmeyers de 250 mL, a partir del micelio de un cultivo semilla proveniente de caja Petri. La composición del medio fue: 30 gL⁻¹ de glucosa, 8,95 gL⁻¹ de peptona, 1 gL⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 gL⁻¹ de MgSO₄·7H₂O y 0,05 gL⁻¹ de tiamina. El tiempo de incubación fue de 10 días. El cultivo se homogenizó en un blender durante 15 s. El inóculo se preparó transfiriendo alícuotas de 5 mL del preinóculo a un erlenmeyer de 250 mL que contenía 45 mL del medio de un medio de cultivo compuesto de 38,95 gL⁻¹ de harina de cereal y 4,77 gL⁻¹ de extracto de levadura. Los cultivos del inóculo se incubaron durante 7 días. Tanto el preinóculo como el inóculo tuvieron un pH inicial de 5,6 y se incubaron a 30°C y 120 rpm.

Cultivos en Reactor

Los cultivos en reactor tuvieron como objetivo determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno del hongo *Ganoderma lucidum*. Se empleó un reactor de tanque agitado Biostat B. Braun de 2 L de capacidad total, que dispone de un agitador mecánico de paletas planas inclinadas. Los cultivos se llevaron a cabo empleando el mismo medio de cultivo del inóculo, a una temperatura de 30 °C, 300 rpm. y una aireación de 1,6 vvm.

Determinación de la concentración de oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto se determinó a partir de la lectura del porcentaje de oxígeno disuelto obtenida con un electrodo polarográfico Ingold. Para convertir la respuesta del electrodo dada en % de OD a su correspondiente valor en gL⁻¹, se empleó el valor de la solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, la cual se midió experimentalmente, calibrando el sensor de oxígeno con agua destilada y realizando la lectura de porcentaje de OD para el medio de cultivo saturado con aire. El porcentaje de saturación de oxígeno en el medio fue de 93,8%. Como la solubilidad del aire en agua a 30°C y 1 atm de presión es de 8,05x10⁻³gL⁻¹ [3], entonces la concentración de O₂ en el medio se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de } O_2 \text{ (gL}^{-1}\text{)} = \text{Lectura sensor (\%)} * \left(8,05 \times 10^{-3} / 93,8 \right)$$

Determinación del tiempo de respuesta del electrodo

El electrodo de oxígeno calibrado, se sumergió en agua exenta de oxígeno (a 30°C y 1 atm, previo burbujeo de gas nitrógeno) para obtener un valor de 0% en la lectura. Posteriormente, se transfirió a un recipiente con agua destilada saturada (previo burbujeo de aire). Cada 10 segundos, se registró el valor del porcentaje de OD hasta que dicho valor se mantuvo relativamente constante en varias lecturas sucesivas. A partir de la gráfica de OD (%) vs. tiempo (s), se determinó el tiempo de respuesta del electrodo como el necesario para obtener un 63% del cambio total en la medida [3].

Determinación de la velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2)

Para la determinación del QO_2 del hongo *Ganoderma lucidum* en el reactor de tanque agitado (ver figura 3), se incrementó la agitación y la aireación del cultivo con el propósito de aumentar el nivel de oxígeno disuelto (OD) en el medio, hasta alcanzar un 80% de saturación. Posterior-

mente, se suspendió la aireación y se registró el descenso en la concentración de OD en el tiempo. En esta etapa la velocidad de descenso en la concentración de OD es igual a la velocidad de consumo de oxígeno por las células del hongo, de modo que la ecuación (1) se simplificó a:

$$\frac{-dC_L}{dt} = QO_2X \quad (12)$$

Los ensayos y la medición de la biomasa se realizaron por triplicado. Los valores de concentra-

ción de OD vs. tiempo se ajustaron a una línea recta y la pendiente obtenida es el valor del QO_2X sin corregir. Para determinar el QO_2 teniendo en cuenta el tiempo de respuesta del electrodo, las concentraciones de OD medidas se corrigieron empleando la ecuación (11). A partir de la gráfica de $E(t)$ vs. $t - \frac{1}{k} [1 - e^{-kt}]$ se encontró el parámetro V que corresponde a la pendiente de la línea y a partir de la cual se calculó el valor de QO_2 .

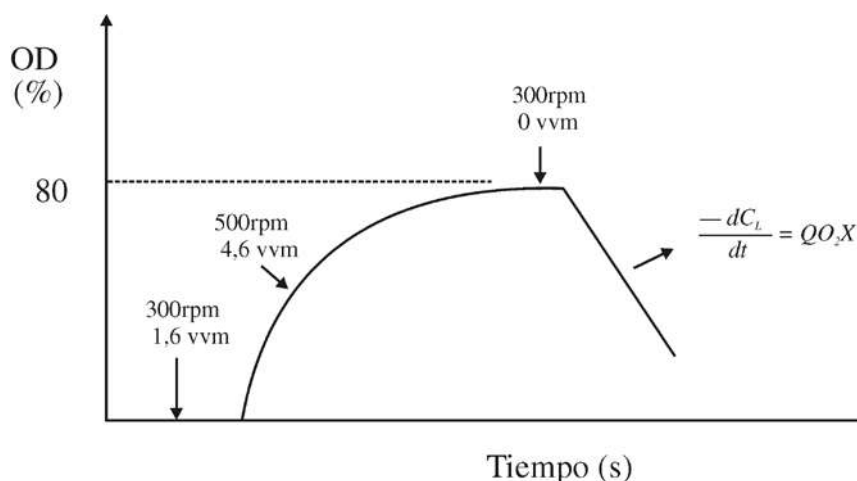


Figura 3 Variación de la concentración de OD en un cultivo de *Ganoderma lucidum* durante la determinación del QO_2

Resultados y Discusión

Tiempo de respuesta del electrodo

La figura 4 muestra la respuesta del electrodo de OD al transferirse desde una solución exenta de oxígeno a una saturada. El tiempo de respuesta se determinó como el tiempo necesario para alcanzar el 63% del valor final de la medida [3], que correspondió a $18,8 \pm 0,03$ s. Este valor servirá para realizar la corrección de los valores de QO_2 por retraso en la respuesta del electrodo determinado de acuerdo con la ecuación (11).

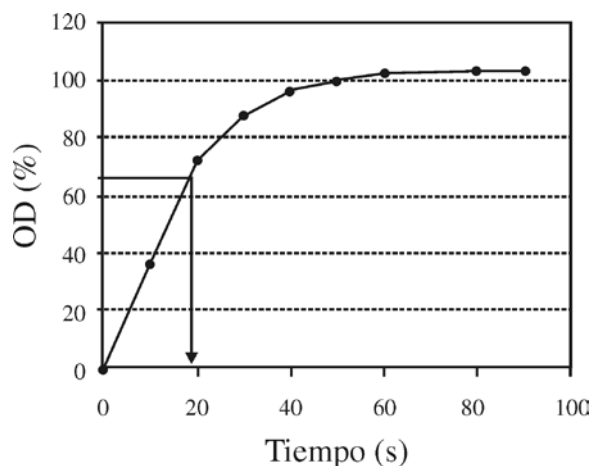


Figura 4 Curva de tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno cuando es sumergido en agua destilada saturada con aire a 30 °C

Velocidad específica de consumo de oxígeno (QO_2)

En la figura 5 se presentan los valores de OD en función del tiempo obtenidos para uno de los tres ensayos realizados en la determinación del QO_2 en el reactor de tanque agitado. También se mues-

tran los valores corregidos por tiempo de respuesta del electrodo.

La siguiente es una muestra del cálculo del QO_2 a partir de la pendiente de las líneas de la figura 3, sin considerar el tiempo de respuesta del electrodo e incluyendo dicho parámetro.

QO_2 sin considerar el tiempo de respuesta del electrodo

$$\frac{QO_2 X}{C^*} = 3,5 \times 10^{-3} s^{-1}$$

$$QO_2 = \frac{3,5 \times 10^{-3} s^{-1} * (8,05 \times 10^{-3} * 0,938) gO_2 \cdot L^{-1}}{8,93 gbiomasa \cdot L^{-1}} * \left(\frac{3600s}{1h} \right) * \left(\frac{1molO_2}{32gO_2} \right) * \left(\frac{1000mmolO_2}{1molO_2} \right) = \frac{0,333 mmolO_2}{gbiomasa \cdot h}$$

QO_2 considerando el tiempo de respuesta del electrodo

$$\frac{QO_2 X}{C^*} = 3,5 \times 10^{-3} s^{-1}, \text{ entonces}$$

$$QO_2 = \frac{3,7 \times 10^{-3} s^{-1} * (8,05 \times 10^{-3} * 0,938) gO_2 \cdot L^{-1}}{8,93 gbiomasa \cdot L^{-1}} * \left(\frac{3600s}{1h} \right) * \left(\frac{1molO_2}{32gO_2} \right) * \left(\frac{1000mmolO_2}{1molO_2} \right) = \frac{0,352 mmolO_2}{gbiomasa \cdot h}$$

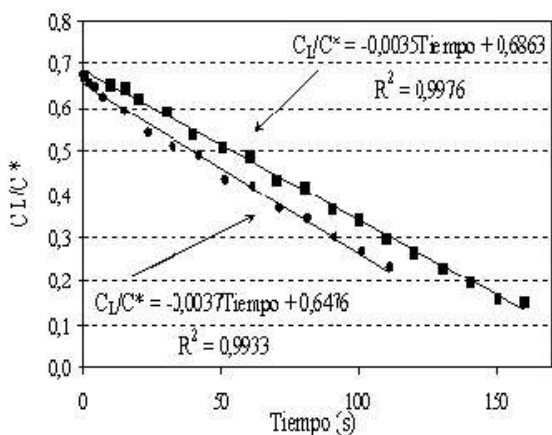


Figura 5 Variación de la concentración de OD en un cultivo de *Ganoderma lucidum* cuando se suspende el suministro de oxígeno. (■) Valores de OD experimentales, (●) Valores de OD corregidos por tiempo de respuesta del electrodo donde $t = t - 1/k (1 - e^{-kt})$. La concentración de biomasa seca en el momento de la medición fue de $8,93 g \cdot L^{-1} \pm 0,57$.

El promedio de los 3 valores de QO_2 obtenidos sin considerar el tiempo de respuesta del electrodo y considerando este parámetro fue de $0,345 mmol O_2 (g biomasa \cdot h)^{-1} \pm 0,0171$ y $0,383 mmol O_2 (g biomasa \cdot h)^{-1} \pm 0,025$ respectivamente. Estos resultados muestran una diferencia de un 9,9% entre los valores de QO_2 . Al realizar la prueba t-student tomando como hipótesis de partida que no hay diferencia entre medias para una probabilidad del 95%, se obtuvo un valor de $P=0,5501 (P>0,05)$, que indica que la hipótesis es válida. Por tanto, no hay diferencia estadística significativa entre el valor de QO_2 determinado considerando tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno y el obtenido sin considerar dicho parámetro. Asumiendo un tiempo de respuesta del electrodo superior al valor determinado experimentalmente, se encontró que para un tiempo de respuesta del electrodo (τ) de 112,8 s existirá una diferencia significativa entre los valores de QO_2 con un valor de $P=0,0396 (P<0,05)$, esto quiere decir que para electrodos con un τ elevado, se requerirá considerarlo en la determinación del QO_2 .

Conclusiones

La metodología derivada para la determinación del QO_2 considerando el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno se aplicó a la determinación del QO_2 para el cultivo del hongo *Ganoderma lucidum*. Los valores de QO_2 obtenidos al incluir el tiempo de respuesta del electrodo de oxígeno no fueron estadísticamente diferentes, debido al bajo tiempo de respuesta del electrodo. Por tanto, para el caso ilustrado empleando un electrodo con un τ de 18,8 s, no se requiere incluir este parámetro en la determinación del QO_2 .

Se encontró que si el electrodo de OD tuviera un τ seis veces superior al real, se requeriría incluirlo en la determinación del QO_2 .

Referencias

1. R. Scriban. *Biotechnología*. México. 2.^a ed. El Manual moderno. 1985. pp. 170-183.
2. R. Quintero. *Ingeniería bioquímica: Teoría y aplicaciones*. 1.^a ed. México. Ed. Alhambra Mexicana, S.A. Vol. 1981. pp. 288-291.
3. P. M. Doran. *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. 1.^a ed. Zaragoza (España). Ed. Acribia. 1995. pp. 207.
4. L. F. Muñoz, J. C. Quintero. *Determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno en la fermentación con Bacillus thuringiensis*. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 1993. pp. 103.
5. M. L. Araujo, R. P. Oliveira, R. C. Giordano and C. O. Hokka. "Comparative studies on Cephalosporin C production process with free and immobilized cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272". *Chem. Eng. Science*, 14th ISCRE. Vol. 51. 1996. pp. 2835-2840.
6. E. Gómez, V. E. Santos, A. Alcon, A. B. Martín, F. G. Ochoa. "Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) capability *Pseudomonas putida*". *Energy & Fuels*. Vol. 20. 2006. pp. 1565-1571.
7. K. D. Rane, K. A. Sims. "Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095". *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 43. 1994. pp. 131-137.
8. A. C. Badino Jr., M. C. R Facciotti, W. Schmidell. "Improving K_L a determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time". *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 75. 2000. pp. 469-474.
9. X. Yang, Z. Mao, S. Yang. "An improved method for determination of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation process". *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 31. 1988. pp. 1006-1009.