

TRANSFERENCIA DE MASA EN PROCESOS FERMENTATIVOS

Ríos Estepa Rigoberto
Buitrago Hurtado Gustavo*

RESUMEN

En el presente trabajo se implementó, con base en la literatura, un modelo teórico a partir de la relación entre la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) y la demanda bioquímica de oxígeno (OUR) en un proceso de fermentación, con el propósito de hallar diferentes condiciones de velocidad de agitación y aireación bajo las cuales el crecimiento microbiano no se vea afectado por deficiencias en el suministro de oxígeno. Tal correlación se adaptó al cultivo con *B.thuringiensis*. de manera que permita estimar la concentración de biomasa máxima a la cual es posible suministrar oxígeno eficientemente con un grupo de condiciones de operación definidas.

Palabras claves: Crecimiento limitado por oxígeno, fermentación, transferencia de masa, *Bacillus thuringiensis*

INTRODUCCIÓN

Un gran número de procesos fermentativos en modo sumergido y con características aeróbicas, presentan bajos rendimientos debido principalmente a la dificultad de disponer en forma eficiente de oxígeno disuelto (O.D.) en el medio líquido. Un caso típico de éste aspecto es la síntesis de protoxinas vía fermentativa usando *Bacillus thuringiensis*

En este sentido, *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) produce proteínas cristalinas durante la fase de esporulación. Algunas de estas proteínas, especialmente la d-endotoxina poseen

actividad biocida contra insectos plaga. Los biopesticidas a base de *B.thuringiensis* son eficaces, biodegradables y de alta especificidad al estado larvario del insecto. (Aronson A.I. y Bekman N., 1986; De Urquijo, 1987)

Entre los factores más importantes en la síntesis del cristal protéico, se incluye el nivel de O.D. en el caldo fermentativo (Holmberg A. y Sievanen R., 1980; Pearson D. y Ward O., 1983). Dadas las características de baja solubilidad del oxígeno en el medio líquido y las diferentes resistencias a su transferencia, un valor determinado del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$) (resultado de la combinación de diferentes valores de velocidad de agitación y aireación),

*Docentes investigadores. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. E-mail: rrios@udea.edu.co.

sólomente suministrará el oxígeno requerido por una determinada concentración de biomasa (Aiba S. y Hemphrey A., 1973; Oldshue J.M. 1983).

Así, es de gran ayuda conocer la máxima concentración de biomasa que es posible mantener con una determinada concentración de O.D. antes de que esta se vea limitada por deficiencias en su suministro.

Atendiendo a lo anterior, y con base en la literatura, se implementó un modelo teórico que a partir del conocimiento de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (μ), permite determinar las condiciones de operación para las cuales el cultivo no presenta deficiencias en el suministro de oxígeno (Kargy F. y Moo-Young M., 1984; Sinclair C. y Mavituna F., 1985). A continuación, y con base en el trabajo de Sinclair C. y Mavituna F., 1985, se presenta la deducción del modelo.

La demanda bioquímica de oxígeno (OUR) está expresada por:

$$OUR = q_{O_2} X \quad (1)$$

La demanda bioquímica específica de oxígeno (q_{O_2}) puede relacionarse con μ a partir del coeficiente de rendimiento basado en el consumo de oxígeno como sustrato Y_{O_2} .

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{O_2}} \quad (2)$$

De donde:

$$OUR = \frac{\mu X}{Y_{O_2}} \quad (3)$$

términos generales, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), puede definirse como:

$$OTR = K_L a (C^* - C_L) \quad (4)$$

donde C^* es la concentración de O.D. en la condición de saturación y C_L es la concentración de O.D. en el medio líquido. En un proceso fermentativo por lotes en donde el nivel de O.D. y la concentración de biomasa cambian con el tiempo, es posible considerar la situación de estado estable para un intervalo de tiempo apropiado. Bajo estas circunstancias, OTR y OUR son iguales (Bailey & Ollis, 1986).

$$K_L a (C^* - C_L) = q_{O_2} m X = \frac{\mu X}{Y_{O_2}} \quad (5)$$

A bajas concentraciones celulares, la OUR es baja aún cuando las células pueden estar respirando a su máxima velocidad de demanda específica de oxígeno (q_{O_2m}); además C_L se incrementa y se aproxima al valor de saturación C^* . Así, el oxígeno se presenta en una condición no limitante para la actividad microbial.

A medida que la concentración de biomasa se incrementa, OUR se incrementa y como consecuencia la concentración de oxígeno disuelto disminuye. A unas condiciones de operación definidas, dada la alta concentración celular el nivel de O.D. puede alcanzar la condición crítica (C_{crit}), la cual depende de las características fisiológicas del microorganismo (Avignone-Rosa y Arcas J., 1992; Nickerson K y Bulla J., 1992).

En este punto aún se cuenta con la cantidad de oxígeno demandada por la concentración celular presente. A partir de este valor, un incremento de biomasa ya no dispone del oxígeno que necesita para su normal actividad.

La C_{crit} se alcanza en razón a una concentración celular (X) presente. La X así obtenida (X_{crit}), constituye la máxima X a la cual bajo determina-

das condiciones de operación, es posible suministrar oxígeno eficientemente.

La m también puede seguir una cinética tipo Michaelis-Menten ,

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (6)$$

donde S es la concentración de sustrato, μ_{\max} es la velocidad específica de crecimiento máxima, relativa al tipo de microorganismo y K_S es la constante de saturación de sustrato, la cual normalmente oscila entre 1 y 10 mg/L para la gran mayoría de bacterias (Bailey & Ollis, 1986; Duarte T, 1995). Así, es posible considerar que siempre que la concentración de sustrato sea mayor que $10K_S$, la célula crece a su máxima velocidad de manera que K_S es muy pequeño en relación con el valor de S y μ será aproximadamente igual a μ_{\max} , ($\mu \cong \mu_{\max}$).

Análogamente, la q_{O_2} sigue una cinética tipo Michaelis con O.D. como sustrato; así, siempre que el nivel de oxígeno disuelto esté arriba de la condición crítica, la célula respira a su máxima velocidad. De ésta manera es posible considerar despreciable el valor de K_S respecto del nivel de O.D. como sustrato, de manera que $q_{O_2} \approx q_{O_2m}$.

Bajo estas consideraciones, a partir de la ecuación (5) se obtiene:

$$K_L a (C^* - C_{crit}) = q_{O_2} m X_{crit} = \frac{\mu X_{crit}}{Y_{O_2}} \quad (7)$$

De la ecuación (7) y a partir de los parámetros conocidos, q_{O_2m} , $K_L a$ y C_{crit} , es posible determinar analítica y/o gráficamente la concentración de biomasa permisible para un grupo de condiciones de operación como limitantes físicas ($K_L a$) y un grupo de limitantes de tipo microbiológico, determinadas por la fisiología del microorganismo (C_{crit} , q_{O_2m}), antes que la actividad microbial llegue a verse limitada por deficiencias en el suministro de oxígeno.

Esta expresión también puede ser representada esquemáticamente.

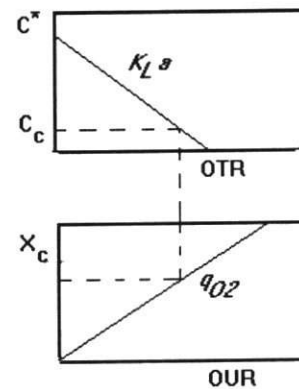


Figura 1. Representación del modelo

La gráfica superior de la figura 1, presenta la variación de C_L [g/L] respecto de la OTR [g/L-h] para diferentes valores de $K_L a$ [h⁻¹]. La gráfica inferior muestra la OUR [g/L-h], asociada a una X [g/L] atendiendo a sus características fisiológicas (q_{O_2} [g O₂/g cél-h]).

Para un determinado valor de $K_L a$ se mantiene una determinada concentración de O.D. que dependiendo de X y de sus características fisiológicas (q_{O_2}) puede llegar a C_{crit} . La X respectiva constituye la máxima concentración celular a la que es posible suministrarle oxígeno eficientemente.

La correlación así implementada puede también usarse para otras cepas del género Bacillus a partir de la determinación experimental de m y siempre que el caldo fermentativo tenga un comportamiento hidrodinámico de carácter newtoniano.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de *B.thuringiensis* usadas fueron: tres cepas nativas, IBUN2.6, IBUN28.1, IBUN3.3 y una estándar HD-1. Estas se sembraron en caja de petri conteniendo medio de cultivo LB (Cerón J. 1989). Se incubaron a 30 °C durante 72 h para luego conservarlas a 4 °C por un período no mayor a 4 meses. El medio de cultivo usado para

todo el trabajo experimental fue un medio mínimo (HCO) descrito por Cerón J., 1989. Este no requiere control de pH. El volumen de inóculo para las diferentes fermentaciones fue 10 % del volumen de operación. Las condiciones de operación para los inóculos fueron: 12 h, 30 °C y 200 rpm en agitador rotatorio. (Berdugo y Zamora, 1995) La cuantificación de biomasa se hizo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Mod 35 (600 nm).

Para la evaluación de m se realizaron fermentaciones a 250 mL volumen de trabajo y por duplicado, con las cuatro cepas de interés. Las condiciones de operación fueron: 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento microbiano. Para determinar los diferentes valores de $K_L a$, se realizaron fermentaciones a 5 L en fermentador de 7 L volumen nominal (Bioflo III, New Brunswick Scientific Co.).

La evaluación experimental de $K_L a$ se hizo a partir del método dinámico, como se describe en (Muñoz y Quintero, 1993; Bayopadhyay B. Humphrey A., 1967; Moresi M y Patete M. 1988; Sobotka y Prokop A., 1980; Van't Riet K., 1979). Las condiciones de operación fueron: 30 °C, velocidad de aireación y agitación variables según planeamiento de la experimentación. En este sentido se desarrolló un diseño factorial de múltiples niveles, 3^2 , como sigue: velocidad de aireación: 0.6, 0.8 y 1.0 volúmenes de aire por volumen de medio por minuto (vvm); velocidad de agitación: 500, 700 y 800 rpm.

El coeficiente de rendimiento de oxígeno en células (Y_{O_2}) se tomó como 1.47 g de células secas/g de O_2 consumido. Dato tomado de la literatura para todas aquellas bacterias que consumen glucosa como sustrato. (Bailey & Ollis, 1986; Duarte T.A., 1995)

RESULTADOS Y DISCUSION

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se presentan las curvas de crecimiento de biomasa con sus respectivas réplicas, a partir de las cuales se determina m para las cuatro cepas de interés.

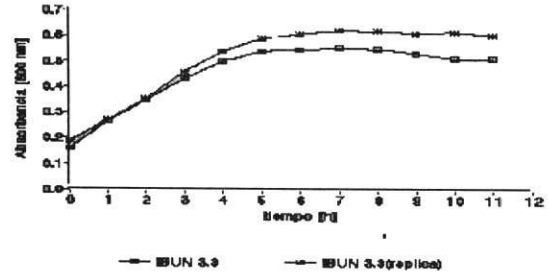


Figura 2. Curva de crecimiento de Biomasa capa IBUN 3.8

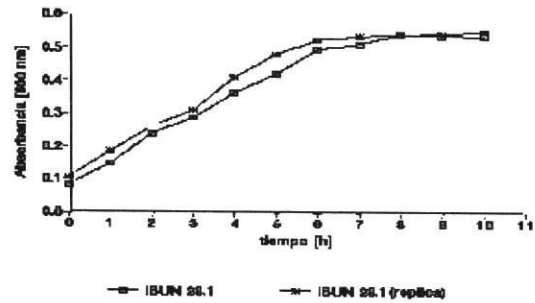


Figura 3. Curva de crecimiento de Biomasa capa IBUN 28.1

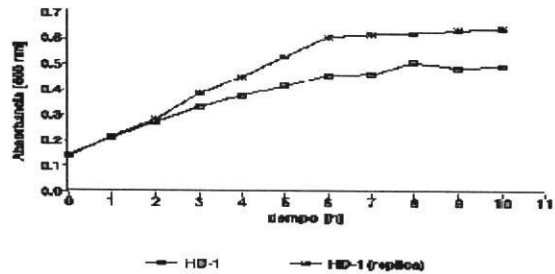


Figura 4. Curva de crecimiento de Biomasa capa IBUN HD-1

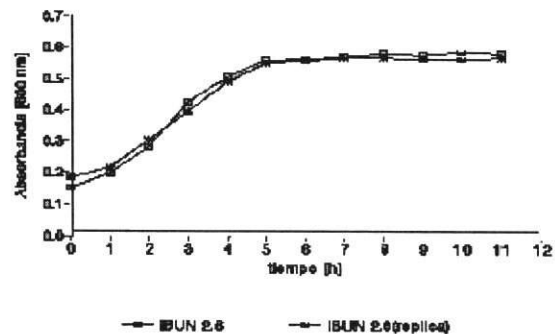


Figura 5. Curva de crecimiento de Biomasa capa IBUN 2.6

Los datos obtenidos se presentan en la tabla 1. Los valores de m así hallados son pequeños si se compararan con los informados en la literatura para otras cepas de B.t.. En relación con la cepa HD-1, el valor obtenido fue 0.18 h^{-1} ; diferentes trabajos en la literatura informan de m igual a

0.193 h^{-1} para esta cepa (Pearson y Ward, 1983; Avignone-Rosa y Arcas, 1992; Berdugo y Zamora, 1995). La tabla 1 muestra además valores de m_{\max} y $q_{O_2 m}$ obtenidos como se indica en la parte teórica.

Tabla 1 *Parametros cineticos para las cuatro cepas de interés*

VARIEDAD	$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$\mu_{\max} \text{ [h}^{-1}\text{]}$	$q_{O_2 m} \text{ [g O}_2\text{/g cél-h]}$
HD-1	0.18	0.18	0.27
HD-1 réplica	0.12		
IBUN28.1	0.26	0.26	0.51
IBUN28.1 réplica	0.24		
IBUN2.6	0.26	0.27	0.53
IBUN2.6 réplica	0.27		
IBUN3.3	0.21	0.23	0.45
IBUN3.3 réplica	0.23		

En la tabla 2 se presentan los valores de $K_L a$ obtenidos a diferentes condiciones de operación según planeamiento de la experimentación. De los resultados presentados, se observa que conforme lo cita la literatura, un incremento en la velocidad de agitación y/o aireación, conlleva a un aumento en el $K_L a$ asociado. Así, al fijar la velocidad de aireación e incrementar la velocidad de agitación, se obtienen incrementos hasta del 44 % en el valor del $K_L a$.

A su vez al fijar la velocidad de agitación y modificar la velocidad de aireación, el incremento en el $K_L a$ llega a ser hasta de un 55 %. Esto hace pensar que a 5 L y bajo las condiciones de operación trabajadas se presenta una mayor contribución de la velocidad de aireación a la transferencia de oxígeno. (Votruba J. y Sobotka M. (1977); Lee Y.H. y Luks., 1983)

Tabla 2 *Resultados obtenidos para el coeficiente volumetrico de transferencia de masa, [h⁻¹] a diferentes condiciones de aireacion y agitacion*

VVM \ RPM	0.6	0.8	1.0
500	40.7	61.8	66.4
700	48.6	79.0	108.9
800	55.4	96.1	118.2

La figura 6 muestra la variación en $K_L a$ al modificar la velocidad de aireación para diferentes valores de agitación y la figura 7 presenta los incrementos en el $K_L a$ por una variación en la velocidad de agitación a diferentes condiciones de velocidad de aireación.

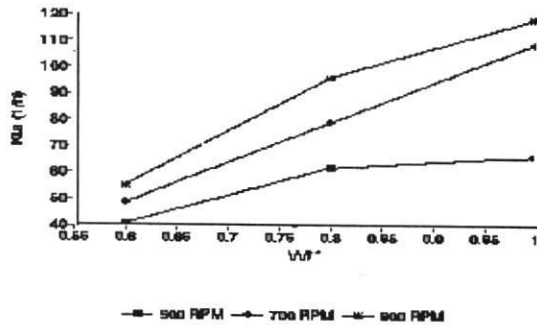


Figura 6. Coeficiente de transferencia de Masa Vs Velocidad de aireación

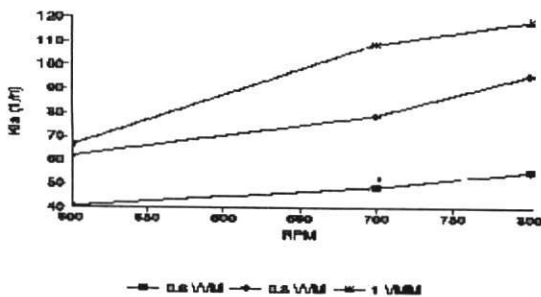


Figura 7. Coeficiente de transferencia de Masa Vs Velocidad de agitación

Respecto a la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), la figura 8 muestra estos valores obtenidos a partir de un incremento en la velocidad de aireación a diferentes condiciones de velocidad de agitación. Para el caso, el comportamiento es uniforme, obteniendo una mayor OTR a medida que se aumenta la velocidad de aireación para una velocidad de agitación fija, excepto a 700 rpm y 0.8 vvm. Esta fermentación fue particularmente importante dada la gran cantidad de espuma generada. El antiespumante adicional (metil silicona emulsionada) fue mayor en relación a las otras fermentaciones lo que pudo constituir una resistencia adicional a la transferencia de oxígeno (Huang W.S. y Kintner R.C.,

1969; Vardak-Sukan F., 1986; Vardak-Sukan F, 1986).

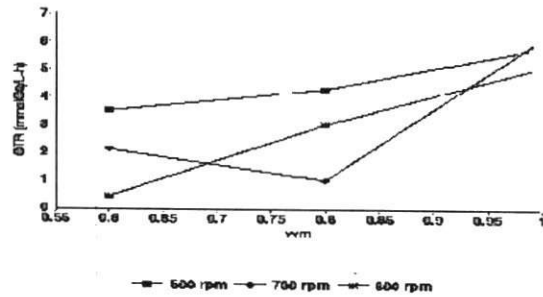


Figura 8. Velocidad de Transferencia de Oxígeno [OTR] Vs. Velocidad de Aireación

De otra parte y como se observa en la figura 8, a altas velocidades de aireación, una modificación en la velocidad de agitación no contribuye significativamente a la transferencia de masa. Es así como a 1.0 vvm se obtiene prácticamente la misma OTR independientemente de si se agita a 700 u 800 rpm.

Finalmente, la figura 9 muestra la representación esquemática del modelo implementado.

La gráfica superior es una representación de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) [g/L-h] contra la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido C_L [g/L] (OTR como abscisa), con $K_L a$ como parámetro. A partir de ella es posible determinar la OTR para algún valor dado de C_{crit} y $K_L a$.

La parte inferior de la figura 9 es una gráfica de la X_{crit} contra la demanda bioquímica de oxígeno (OUR) usando la demanda bioquímica específica máxima de oxígeno (q_{O_2m}) [g oxígeno/ g célula-h], como parámetro. Del tratamiento experimental en el presente trabajo y a partir de la ecuación (4), se dibujan valores típicos de $K_L a$ obtenidos a nivel de banco y valores típicos de q_{O_2m} para diferentes cepas de B.t. calculados como se indica la parte introductoria (ecuación 1, 2 y 3).

La OUR como abscisa utiliza la misma escala que la OTR. Así, para un valor de $K_L a$ dado y una $C_L = C_{crit}$ (punto 1), es posible determinar la OTR (punto 2) la cual es igual a la OUR en condiciones de estado estable (punto 3), lo que permite hallar X_{crit} para la cepa de interés (punto 4), haciendo uso de la gráfica inferior (punto 5). La X_{crit} así hallada constituye la máxima concentración celular en [g/L] a la que es posible suministrar eficientemente oxígeno sin que se presente deficiencias en su suministro.

Un incremento en X implica un ajuste en las condiciones de operación (vvm, rpm) que aseguren un aumento en el $K_L a$ de manera que supla satisfactoriamente la demanda de oxígeno por parte de una nueva concentración de células. De esta manera el cultivo no presentará alteraciones en su metabolismo por deficiencias de oxígeno.

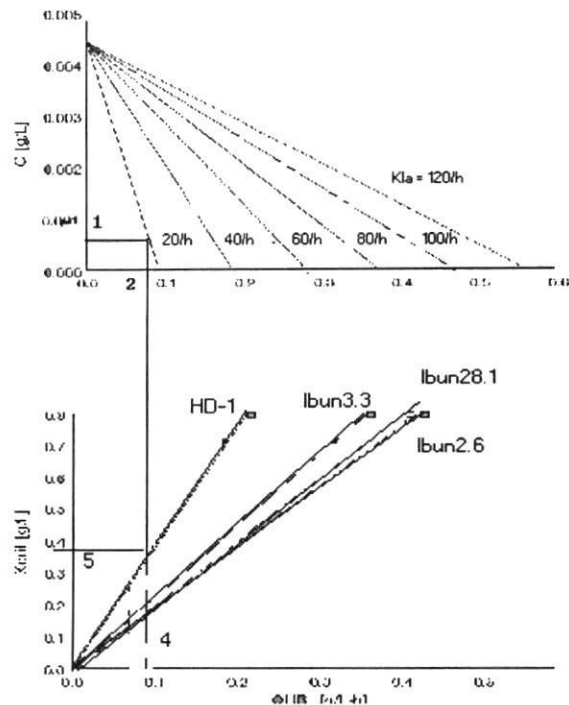


Figura 9. Modelo Implementado (Representación gráfica)

A nivel de laboratorio y para propósitos de Investigación y Desarrollo, el modelo tiene gran aplicabilidad en tanto que con base en la experiencia es posible escoger entre varias alternativas de condiciones de operación que el modelo sugiere; a partir del conocimiento de las características cinéticas del microorganismo y de las especificaciones en la composición del medio de cultivo, se estima la máxima concentración celular a obtener, a partir de esta y con ayuda del modelo se tienen diversos valores de $K_L a$, todos ellos determinando niveles de concentración de O.D. cercanos pero nunca menores a C_{crit} . Las condiciones de operación así halladas constituyen una primera aproximación en el establecimiento de las mejores condiciones de aireación y agitación a que se opere el cultivo.

CONCLUSIONES

Con base en la literatura se implementó un modelo teórico que a partir del conocimiento de la velocidad específica de crecimiento de biomasa para el microorganismo, permite determinar las condiciones de operación (velocidad de agitación y velocidad de aireación), bajo las cuales el oxígeno no se presenta como limitante para el normal desarrollo de la actividad microbial durante un proceso fermentativo.

El uso del modelo puede hacerse extensivo para el estudio de otras cepas del género *Bacillus* siempre que se tomen en cuenta diferentes características de transferencia de masa, reología del medio de cultivo y su desviación del comportamiento newtoniano, aporte de la aireación superficial a la transferencia de oxígeno y similitud geométrica en el equipo de fermentación.

Haciendo uso del modelo, es posible parametrizar el nivel de O.D. en una condición de no limitación y estudiar la incidencia de otras variables (pH y composición del medio de cultivo, entre otros) sobre la producción del metabolito de interés. De esta forma, el modelo es útil en el planeamiento de un diseño experimental, desde el punto de vista teórico, de manera que antes de

toda experimentación se descarten condiciones de limitación de oxígeno, poco favorables para la síntesis del metabolito.

Finalmente, al estudiar la incidencia de las velocidades de agitación y aireación sobre la OTR, a 5 L y bajo las condiciones de operación trabaja-

das, fue más notorio el efecto de la velocidad de aireación, generando un mayor incremento en la OTR por un cambio en su nivel a una velocidad de agitación fija, que el obtenido cuando se fija la velocidad de aireación y se modifica la velocidad de agitación.

BIBLIOGRAFIA

- AIBA S, HUMPHREY A.E. y MILLIS S N.. Biochemical Engineering. 2nd. ed. Academic Press. N. Y., 1973
- ARONSON A.I., BEKMAN N., 1986. «Bacillus thuringiensis and related insect pathogens», En: Microbiology Rev. 80: 1-24
- AVIGNONE-ROSSA C. y ARCAS J. 1992. «B.t. growth, sporulation and -endotoxine production in oxygen limited and non limited cultures». En: World Journal of Microbiology. 8: 301-304
- BAILEY J. y OLLIS D., Biochemical Engineering Fundamentals, 2da ed. Ed. McGraw Hill, N.Y., 1986.
- BANDYOPADHYAY B., HUMPHREY A.E. y TAGUCHI H. 1967 «Dynammic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems». En: Biotech. Bioeng. 9: 533-544.
- BERDUGO C. y ZAMORA A. 1995 «Estudio preliminar de diseño de un medio de cultivo para la síntesis de Delta-endotoxina», tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, para optar el título de «Ingeniero Químico»
- CERON J. 1989. Universidad: Ciencia y Tecnología. 1: 66-70
- COUCH T. y ROSS D.A. 1980. «Production and utilization of B.t.», En: Biotech. Bioeng. 22: 1279-1304
- DE URQUIJO N.E. 1987. «Producción de B.t. para el control de plagas» CINESTAV-IPN, México, 1987
- DUARTE T. A., Introducción a la Ingeniería Bioquímica, 1a. ed. Universidad Nacional Ed., Santafé de Bogotá, 1995
- GOLDBERG I., Sneh. 1980. «Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of B.t.». En: Biotech. Lett . 2: 419-426
- HOLMBERG A. SIEVANEN R. 1980 «Fermentation of B.t. for exotoxin production». En: Biotech. Bioeng. 22: 1707-1724
- HUANG W.S. y KINTNER R.C. 1969 «Effects of surfactants on mass transfer inside drops». En: AIChE Journal. (15)

- KARGY F. y MOO-YOUNG M. 1984 «Transport phenomena in Bioprocess», En: Comprehensive Biotechnology, Murray Moo-Young ed. Canadá.
- LEE Y.H. y LUKS. 1983 «Aeration». En: Annual Report in fermentation Processes, Academic Press.ed. 6:101-147
- MORESI M. y PATETE M.1988 «Prediction of $K_L a$ in conventional stirred fermenters» En: J. Chem. Technology, Biotechnology convencional. 42: 197-210
- MUÑOZ L. y QUINTERO J. C. 1993 «Determinación del $K_L a$ en la fermentación con B.t.», tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia, para optar el título de «Ingeniero Químico».
- NICKERSON K.W., BULLA JR. 1992, «Physiology of spore forming bacteria associated with insect...». En: Applied Microbiology. 1: 124-128
- OLDSHUE J.M. 1983 «Mixing in fermentation processes». En: Annual reports on fermentation processes.
- PEARSON D. and WARDO. P. 1983 «Effect of culture condition on growth and sporulation of B.t. and development of media for production of the protein crystal endotoxin». En: Biotech. Lett. 10: 451-456
- SINCLAIR C.G. y MAVITUNA F. 1985 «Graphical method for determination of growth limited by oxygen». En: Biotechnology Lett. 2: 69 - 74
- SOBOTKA M. y PROKOP A. 1982 «Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems». En: Annual reports on fermentation processes.
- VAN'T RIET K. 1979 «Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels». En: Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev. 18: 357 - 364
- VARDAK-SUKAN F. 1986 «Dynamic of oxygen mass transfer in bioreactor, Part I. Operating variables affecting mass transfer» En: Process Biochem. 20: 181-184
- VARDAK-SUKAN F. 1986 «Dynamic of oxygen mass transfer in bioreactor, Part II. Design variables». En: Process Biochem. 21: 40 - 44.
- VOTRUBA J. y SOBOTKA M. 1977. «Evaluation of aeration capacity from cultivation data files: Application to large-scale fermentation». En: Biotech. Bioeng. 19: 1553-56