

CONSUMO DE OXÍGENO DURANTE EL CRECIMIENTO DE *PHAFFIA RHOOZYMA* Y *FLAVOBACTERIUM DEHYDROGENANS*¹

CHERLYS INFANTE JIMÉNEZ²

RESUMEN

Se han realizado experiencias para calcular el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, K_{La} y la velocidad de consumo de oxígeno durante el crecimiento de la levadura *Phaffia Rhodozyma* y la bacteria *Flavobacterium Dehydrogenans*.

Se utilizó un método dinámico para la determinación experimental del K_{La} y la velocidad de consumo de oxígeno.

El seguimiento de la variable oxígeno disuelto se hizo digitalizando la señal del sensor y alimentándola a un computador para obtener una gráfica de dicha variable en función del tiempo, cuyo posterior tratamiento y análisis produce los valores de K_{La} y la velocidad de consumo de oxígeno.

Palabras claves: Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, velocidad de consumo de oxígeno, método dinámico.

ABSTRACT

*Assays have been performed in order to obtain volumetric oxygen coefficient values (K_{La}) and oxygen uptake rate during the growth of the yeast *Phaffia Rhodozyma* and the bacteria *Favobacterium Dehydrogenans*.*

A dynamic method was used for the experimental measurement of K_{La} and oxygen uptake rate.

The monitoring of the dissolved oxygen variable was achieved by means of an analogical/digital converter, its output

¹ Como contribución a la línea de investigación de obtención de pigmentos carotenoides que se desarrolla en el Instituto Químico de Barriá en Barcelona, España.

² Docente de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena. Teléfono 6698179 - Fax 6698323

been fed to a computer obtaining a plot of this variable as a function of time for later treatment and analysis in order to have the *K_{la}* and oxygen uptake rate values.

Key Words: volumetric oxygen transfer coefficient, oxygen uptake rate, dynamic method.

INTRODUCCIÓN

Los avances en la productividad de los procesos biotecnológicos con frecuencia están limitados por el transporte de un sustrato o producto hacia o desde el medio nutritivo.

El oxígeno es un ejemplo de sustrato cuya transferencia es un factor crítico en crecimientos aerobios.

La velocidad de consumo de oxígeno indica la demanda del sistema biológico en cualquier punto del ciclo fermentativo; en cultivo por lotes es mínima en la fase de latencia, aumentando progresivamente hasta alcanzar su valor máximo durante la fase logarítmica y luego decrece hasta un valor pequeño en la fase estacionaria.

Una gráfica de la velocidad de consumo de oxígeno en función de la velocidad específica de crecimiento debe ser lineal con ordenada en el origen igual a la velocidad de captación de oxígeno para el mantenimiento celular¹.

Para la estimación del *K_{la}* en procesos fermentativos se pueden usar los métodos dinámicos^{2,3,4,5,6}, o el método del balance de

oxígeno de estado estacionario^{7,8,9,10}, siendo este último el más apropiado para cultivos viscosos con comportamiento no newtoniano como es el caso de microorganismos de tipo filamentoso (hongos y estreptomicetos)¹¹.

La relación velocidad de consumo de oxígeno a *K_{la}* es una función de la concentración de biomasa, el estado fisiológico de las células, la velocidad de agitación y el caudal de aire; por esto puede considerarse como un parámetro indicador de la influencia del suministro de oxígeno sobre el estado fisiológico del cultivo¹¹.

La producción de pigmentos carotenoides por *Phaffia Rhodozyma* y *Flavobacterium Dehydrogenans* depende del suministro de oxígeno al medio fermentativo, por tanto se hace necesario determinar la velocidad de consumo de oxígeno y el coeficiente de transferencia de oxígeno durante el crecimiento.

Igualmente se deben establecer las condiciones de velocidad de agitación y caudal de aire para suplir las exigencias de oxígeno de las cepas mencionadas.

PARTE EXPERIMENTAL

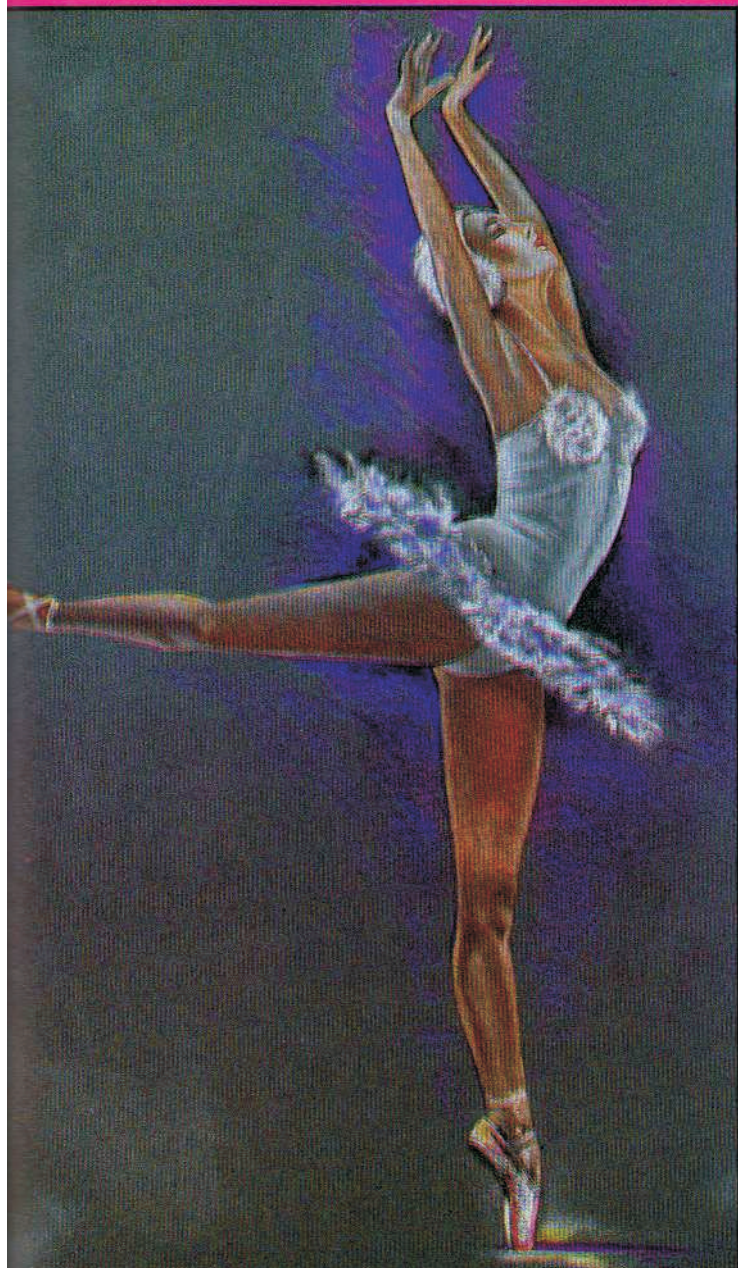
1. EQUIPO

Se utilizaron dos biorreactores tipo tanque agitado de 7 y 14 litros, identificados como Applikon 187 y Chemap LF14 respectivamente.

PLURI-B®

• *Inyectable liofilizado* • *Tabletas*

Asegura plena movilidad



- *Mejora los síntomas de las neuropatías periféricas*
- *Mayor potencia antineurítica*
- *Recupera la capacidad física y laboral*
- *Efectividad desde el inicio del tratamiento*
- *Aporta los factores esenciales para la homeostasis del sistema nervioso*

COMPOSICION: *tabletas*, cada tableta contiene: Vitamina B1.....65 mg Vitamina B6..... 100 mg. *Inyectable liofilizado*, cada frasco ampolla con liofilizado contiene: Vitamina B1.....100 mg Vitamina B6..... 100 mg Vitamina B12..... 1.000 mcg.

INDICACIONES: Neuropatías secundarias a deficiencia de vitaminas del complejo B. **Contraindicaciones:** hipersensibilidad a la tiamina. **POSOLOGIA:** *Tabletas:* 1 tableta 3 veces al día. *Inyectable liofilizado:* 1-2 frascos ampolla I.M. en el día. **PRESENTACIONES Y REGISTROS SANITARIOS :** *Tabletas:* caja x 12 tabletas. Reg. San. INVIMA M-006406 R1. *Inyectable liofilizado:* caja con frasco ampolla con liofilizado y ampolleta de solvente x 2 ml . Reg. San. INVIMA M-006231 R1. **BIBLIOGRAFIA:** -USP-D1. 1993; Pág. 2777-2797 - **AMA Vitamins and Minerals.** Chapter 96 Pág. 2157-2179 Drug Evaluations. Annual 1994. - **Stollhoff K, Schulte FJ:** Vitamin B12 and brain development. Eur J Pediat 1987; 146: 201.



ITALMEX
PRODUCTOS
CIENTIFICOS

sindil®

Secnidazol



Ultimo avance tecnológico
para el control de la amebiasis-
giardiasis-tricomoniasis

COMPOSICION-Tabletas: cada tableta contiene: **Sindil Adultos:** Secnidazol.....500 mg **Sindil Pediátrico:** Secnidazol.....250 mg

INDICACIONES: Tricomoniasis, amebiasis y giardiasis. **Contraindicaciones:** hipersensibilidad al secnidazol; niños menores de 2 años, primer trimestre del embarazo. **Precauciones:** debe evitarse las bebidas alcohólicas durante el tratamiento. Pacientes con discrasias sanguíneas. Enfermedades del sistema nervioso central. Puede producir cáncer en animales de experimentación. **PRESENTACIONES Y REGISTRO SANITARIO:** **Sindil adultos:** caja x 4 tabletas. Reg. San. M-010056 Minsalud. **Sindil Pediátrico:** caja por 4 tabletas. Reg. San. M-012437 Minsalud. **BIBLIOGRAFIA:** - **Cesari J, et al:** Treatment of amoebiasis with shorter secnidazole therapy. *Med Trop* 1982; 42 (5): 527. - **Latonio A A:** Efficacy of a single dose of secnidazole in the treatment of acute and chronic amoebiasis. *J Trop Med Hyg* 1988; 91 (4): 202. - **Rossingnol J, et al:** Nitroimidazoles in the treatment of Trichomoniasis, giardiasis, and amoebiasis *J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1984; 22(2): 63.



ITALMEX
PRODUCTOS
CIENTÍFICOS

dolex[®]

DOLOR FIEBRE

Tabletas Adultos - Tabletas pediátricas masticables
Jarabe - Gotas

ESTOS
SON
LOS
4
ASES
DE
LA
FAMILIA
dolex[®]

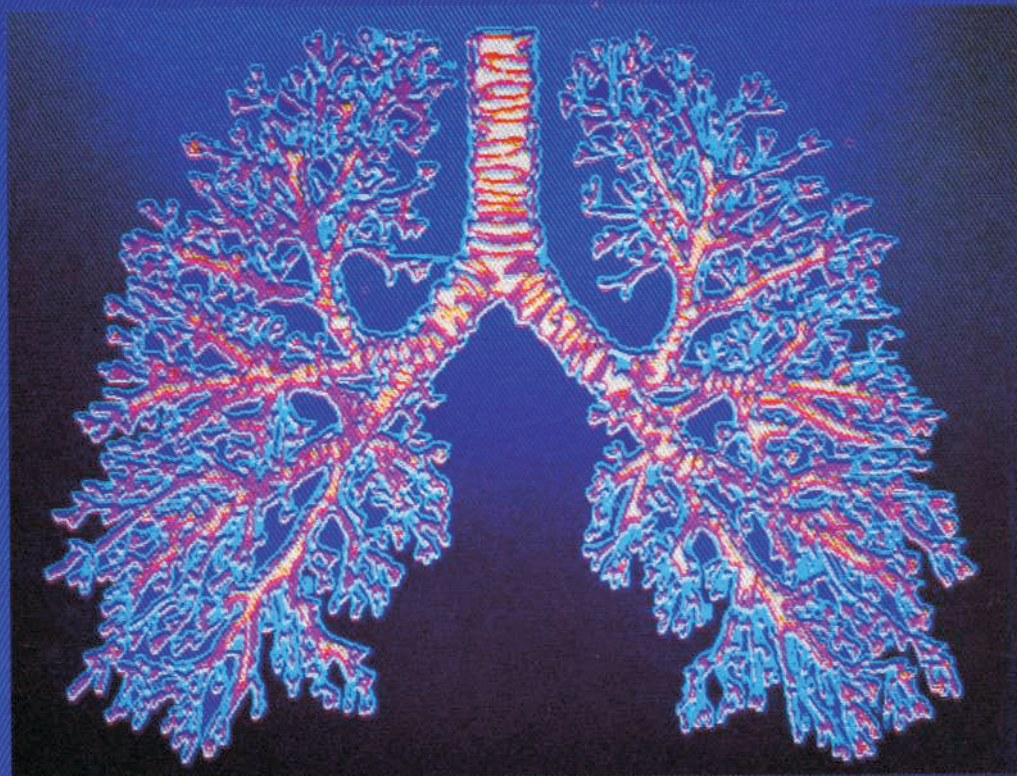


dolex 500-Tabletas: Caja 50 sobres x 2 tabletas. Caja 20 sobres x 10 tabletas. Reg. San. M-000307-R1 Minsalud. Dolex Jarabe: Frasco x 90 ml leg. San. INVIMA M-007261-R1. Dolex Gotas: Frasco con gotero por 30 ml Reg. San. INVIMA M-007227-R1. Dolex Pediátrico Masticable: Caja de 2 sobres x 10 tabletas. Caja de 10 sobres x 10 tabletas. Reg. San. M-011879 Minsalud. **BIBLIOGRAFÍA:** • Insel PA: Analgesic-antipyretics and anti-inflammatory agents. Drugs employed in the treatment of gout. In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, ed A.G. Gilman, L.S. Goodman, A. Gilman, pp. 638-681. New York: Macmillan 8th Ed. 1990. • Drug Information for the Health Care Professional, USP DI, 13th Edition, Vol. I, -9. 1993. • Payan DG: Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs; Nonopioid Analgesics; Drugs used in gout. In: The Basic & Clinical Pharmacology, ed. Katzung BG. 491-512. Fifth Ed. 1992.



ITALMEX
PRODUCTOS
CIENTÍFICOS

Sinergismo terapéutico en el manejo de las enfermedades respiratorias de tipo obstructivo



ULTRABRON® T

Ambroxol-Terbutalina/Italmex
Mucolítico Broncodilatador

Relajación bronquial
sostenida

ULTRABRON®

Ambroxol/Italmex
Mucolítico

Acción depurativa en
el sistema respiratorio

COMPOSICION: cada cucharadita (5 ml) contiene: Ambroxol HCl.....10 mg. Terbutalina Sulfato.... 1.5 mg. **INDICACIONES:** Mucolítico broncodilatador. **ADMINISTRACION Y DOSIS:** - **Dosis pediátrica de Terbutalina** 0.25 mg/kg/día repartida en 3 tomas. - **Dosis pediátrica de Ambroxol** 1.0-1.5 mg/kg/ día repartida en 3 tomas, que equivale a: •**Lactantes:** 1/2 cucharadita (2.5 ml) cada 12 horas. •**Niños 1-3 años:** 1/2 cucharadita (2.5 ml) cada 8 horas. •**Niños de 3-6 años:** 1/2-1 cucharadita (2.5-5 ml) cada 8 horas. •**Niños de 6-12 años:** 1-1 1/2 cucharaditas (5-7.5 ml) cada 8 horas. •**Adultos:** 1 cucharada (15 ml) cada 8 horas. **PRESENTACION Y REGISTRO SANITARIO:** Jarabe: frasco x 120 ml. Reg. San. M-010088 Minsalud. **Contraindicaciones:** Hipersensibilidad a sus componentes y primer trimestre del embarazo. Tirotoxicosis y pacientes con úlcera péptica. **Precauciones:** debe utilizarse con precaución en pacientes con trastornos cardiovasculares, diabetes, hipertensión o hipertiroidismo. Efectos secundarios: ocasionalmente pueden presentarse molestias gastrointestinales, ligero temblor y palpitaciones. **BIBLIOGRAFIA:** - **Wauer-RR et al:** Randomized double blind trial of ambroxol for the treatment of respiratory distress syndrome. Eur-J-Pediatr. 1992 May; 151 (5): 357-63. - **Lusuardi-M et al:** Role of surfactant in chronic obstructive pulmonary disease: therapeutic implications. Respiration. 1992; 59 Suppl 1: 28-32. - **Mistretta-A et al:** Lung permeability in smokers after ambroxol treatment. Respiration. 1989; 55 Suppl 1: 79-83.

COMPOSICION: Jarabe Adultos: cada cucharadita (5 ml) contiene: Ambroxol HCl..... 30 mg. **Jarabe Pediátrico:** cada cucharadita (5 ml) contiene: Ambroxol HCl.....15 mg. **INDICACIONES:** mucolítico. **ADMINISTRACION Y DOSIS:** Jarabe Adultos: 1 cucharadita (5 ml) 3 veces al día. Jarabe Pediátrico: 1.0-1.5 mg/kg/día. Repartida en 3 tomas, lo cual equivale a: •**Niños menores de 3 años:** 1/2 cucharadita (2.5 ml) 2 veces al día. •**Niños de 3-6 años:** 1/2 cucharadita (2.5 ml) 3 veces al día. •**Niños de 6-12 años:** 1 cucharadita (5 ml) 3 veces al día. **PRESENTACIONES Y REGISTROS SANITARIOS.** Jarabe Adultos: Frasco x 120 ml. Reg. San. M-009789 Minsalud. **Jarabe Pediátrico:** frasco x 120 ml. Reg. San. M-009790 Minsalud. **Contraindicaciones:** Hipersensibilidad al ambroxol, úlcera péptica y primer trimestre del embarazo. Efectos secundarios: ocasionalmente ligeras molestias gastrointestinales. **BIBLIOGRAFIA:** - **Wauer-RR et al:** Randomized double blind trial of ambroxol for the treatment of respiratory distress syndrome. Eur-J-Pediatr. 1992, 151 (5): 357-63. - **Lusuardi-M et al:** Role of surfactant in chronic obstructive pulmonary disease: therapeutic implications. Respiration. 1992; 59 Suppl 1: 28-32. - **Mistretta-A et al:** Lung permeability in smokers after ambroxol treatment. Respiration. 1989; 55 Suppl 1: 79-83.

ITALMEX
PRODUCTOS
CIENTIFICOS

2. SENSORES

2.1 Medidor de oxígeno disuelto y amplificador marca Ingold. En las experiencias con el reactor Chemap LF14 se utilizó un sensor con un tiempo de respuesta al 63.2% de 18.5s; mientras que con el Applikon 187 se utilizó un sensor con un tiempo de respuesta al 63.2% de 22.5s.

La respuesta es en porcentaje de oxígeno disuelto con respecto al valor de saturación. En ambos casos, la corriente medida por el amplificador es proporcional a la presión parcial de oxígeno en el medio.

Los medidores son totalmente esterilizables

2.2 Para la medida de la temperatura se utilizó una sonda Pt-100

2.3 Para la medida del pH se utilizó un sensor marca Ingold modelo 465

3. CONDICIONES OPERATIVAS

En el caso de *Flavobacterium Dehydrogenans*, la temperatura fue de 29°C, el caudal de aire varió entre 3.5 y 14.7l/min, y la velocidad de agitación entre 400 y 800 rpm.

Para *Phaffia Rhodozyma* la temperatura se mantuvo entre 20 y 23°C, el caudal de aire varió entre 3.5 y 14.7l/min y la velocidad de agitación entre 250 y 1260 rpm.

Las experiencias con la levadura se realizaron en el biorreactor Applikon 187, y con la bacteria en el Chemap LF14.

4. MEDIOS DE CULTIVO Y MICROORGANISMO

La tabla 1 presenta la composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de cada microorganismo.

Las cepas utilizadas tienen la siguiente identificación;

Flavobacterium Dehydrogenans ATCC 13930
Phaffia Rhodozyma CECT 1690.

5 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL K_{La} Y LA VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO

Para realizar la medida de K_{La} y la velocidad de consumo de oxígeno durante el crecimiento celular, se utilizó la técnica propuesta por Bandyopadhyay y Humphrey¹².

La respuesta del sensor de oxígeno disuelto es adquirida por computador mediante un convertidor analógico/digital de ocho entradas analógicas, utilizando el programa de adquisición de datos PROCON;EXE¹³, con un periodo de muestreo de 1s.

El procesado de la información se hizo con el programa DATMAN. EXE¹³.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. FLAVOBACTERIUM DEHYDROGENANS

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para este microorganismo.

Las condiciones operativas que suplen las necesidades de oxígeno del microorganismo son 500 rpm y 4.2 l/min de aire.

2. PHAFFIA RHODOZYMA

La tabla 3 presenta los valores de velocidad de consumo de oxígeno y *K_{la}* obtenidos durante el crecimiento de este microorganismo.

Las condiciones operativas que suplen las necesidades de oxígeno del microorganismo son 830 rpm y 4 l/min.

Las necesidades de oxígeno para ambas cepas varían entre 20 y 30 mmoles/l*h¹⁴.

En este instante se utilizó el método del escalón en la agitación para la determinación del *K_{la}*, el cual no permite la medición de la velocidad de consumo de oxígeno.

El método utilizado para medir la velocidad de consumo de oxígeno es poco sensible en fase de latencia y en fase estacionaria, por tanto al detener el flujo de aire durante estas fases, no se logra una disminución marcada en los niveles de oxígeno disuelto con la cual se pueda medir la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo en estos tiempos de muestreo; en estas condiciones las determinaciones de *K_{la}* se realizan mediante el intercambio aire-nitrógeno.

NUTRIENTES	<i>F. Dehydrogenans</i>	<i>P. Rhodozyma</i>
NH ₄ Cl	2	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2
MgSO ₄ 7H ₂ O	2	0.5
KH ₂ PO ₄ ; K ₂ HPO ₄	2(PO ₄) ⁻³	-
KH ₂ PO ₄	-	3
EXTRACTO DE LEVADURA	4	4
GLUCOSA	5	20

TABLA 1. MEDIOS DE CULTIVO

TIEMPO (h)	$Kla(s^{-1})$	VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO ($mg/l*s$)	PESO SECO	CONSUMO ESPECIFICO DE OXIGENO ($mg/g*s$)
1.43	$2.77*10^{-2}$	-	2.018	-
3.36	$2.87*10^{-2}$	-	2.685	-
4.72	$1.72*10^{-2}$	$8.4*10^{-2}$	3.26	$2.57*10^{-3}$
5.72	$1.91*10^{-2}$	$1.36*10^{-2}$	3.77	$3.6*10^{-3}$
7.7	$2.73*10^{-2}$	$2.0*10^{-2}$	5.093	$3.9*10^{-3}$
23.6	$1.33*10^{-2}$	-	6.718	-
31.94	$1.2*10^{-2}$	-	7.00	-
32.22	$1.13*10^{-2}$	-	7.014	-

TABLA 2. VALORES EXPERIMENTALES DE Kla , VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO Y CONSUMO ESPECIFICO DE OXIGENO PARA *F. DEHYDROGENANS*

TIEMPO (s)	$Kla(s^{-1})$	VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO ($mg/l*s$)
5450	$1.25*10^{-2}$	-
53800	$1.47*10^{-2}$	$4.4*10^{-2}$
68800	$1.53*10^{-2}$	$6.07*10^{-2}$
76000	$1.54*10^{-2}$	$5.7*10^{-2}$
84000	$1.5*10^{-2}$	$5.5*10^{-2}$
85000	$1.44*10^{-2}$	-
90000	$9.5*10^{-3}$	$4.1*10^{-2}$
94300	$1.59*10^{-2}$	$3.8*10^{-2}$
145300	$1.59*10^{-2}$	-
148440	$1.56*10^{-2}$	-

TABLA 3. VALORES DE Kla Y VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXÍGENO PARA *P. RHODOZYMA*

BIBLIOGRAFÍA

1. Kamp, F; Wase, DAJ, McManamey, W.J.; Mendoza O.; Thayanithy, K.; A comparison of some methods of estimating volumetric mass transfer coefficients in an external loop airlift fermentor. *Biotechnol. Bioengng* vol. 30:179-186. 1987.
2. Linek, V.; Sinkule, J.; Benes, P.; Critical assessment of the dynamic double response method for measuring K_{La} ; Experimental elimination of dispersion effects, *Chem Engng Sci*, vol 47 No 15/16; 3885-3894.1992.
3. Chang, H.N.; Halard, B.; Moo-young, M.; Measurement of K_{La} by a gassing-in method with oxygen enriched air, *Biotech, Bioengng*, vol 34: 1147 - 1157, 1989.
4. Linek, V.; Benes, P.; Sinkule, J.; Dynamic pressure method for K_{La} measurement in large scale bioreactors. *Biotech. Bioengng* vol. 33: 1406 - 1412.1989.
5. Linek, V.; Sinkule, J.; The influence of gas and liquid axial dispersion on determination of K_{La} by dynamic method, *Trans Chem. Engng* vol 69: 308 - 312. 1991.
6. Linek, V.; Benes, P.; Vacek, V.; Measurement of aeration capacity of fermentors. *Chem. Engng. Technol.* vol 12: 213-216.1989.
7. Imai, Y.; Takesi, H.; Matsumura, M.; A simple sodium sulfite feeding method for K_{La} measurement in large scale fermentors, *Biotech, Bioengng*, vol 29: 982 - 993, 1987.
8. Linek, V.; Benes, P.; Sinkule, J.; Critical assessment of the steady state sodium sulfite feeding method for K_{La} measurement in fermentors *Biotech. Bioengng.* vol 35: 766 - 770.1990.
9. Steel, R.; Brierly, M.R.; M.R.; Agitation aeration in submerged fermentation: L A comparative study of the sulfite and polarographic methods for measuring oxygen solution rates in fermentor, *J., of Appl. Microbiol* vol 7: 51 - 56. 1959.
10. Cruz, A.A.; Transferencia de oxígeno en el proceso fermentativo de *Rhodotorula Rubra*. Tesis de Master. Instituto Químico de Sarriá, 1989.
11. Paca, J.; Grégr, V.; Method for the determination of oxygen transfer coefficients with the correction for the actual cultivation conditions. *J. Appl. Chem Biotechnol.* vol 27: 155 - 164. 1977.
12. Bandyopadhyay, B.; Humphrey, A.E; Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficients in fermentation systems. *Biotechnol. Bioengng.* vol IX; 533 - 544. 1967.
13. Mena, D.A.; Diseño y programación de un sistema de adquisición de datos y control de procesos. Tesis de Master. Instituto Químico de Sarriá. 1993.
14. Johnson, E.A.; Lewis, M.J.; Asthaxanthin formation by the yeast *Phaffia Rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* vol 115: 173 - 183., 1979.