

# Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano

Dra. Ing. María Teresita Castañeda

Copyright © Este apunte fue redactado por la Dra. María Teresita Castañeda para la cátedra de Biotecnología, perteneciente a la carrera de Ingeniería Química.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL- FACULTAD REGIONAL LA PLATA

Licencia plantilla Latex:

The Legrand Orange Book

LaTeX Template

Version 2.1.1 (14/2/16)

This template has been downloaded from: <http://www.LaTeXTemplates.com>

Original author:

Mathias Legrand ([legrand.mathias@gmail.com](mailto:legrand.mathias@gmail.com))

with modifications by: Vel ([vel@latextemplates.com](mailto:vel@latextemplates.com))

License: CC BY-NC-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>)

*Año 2019*

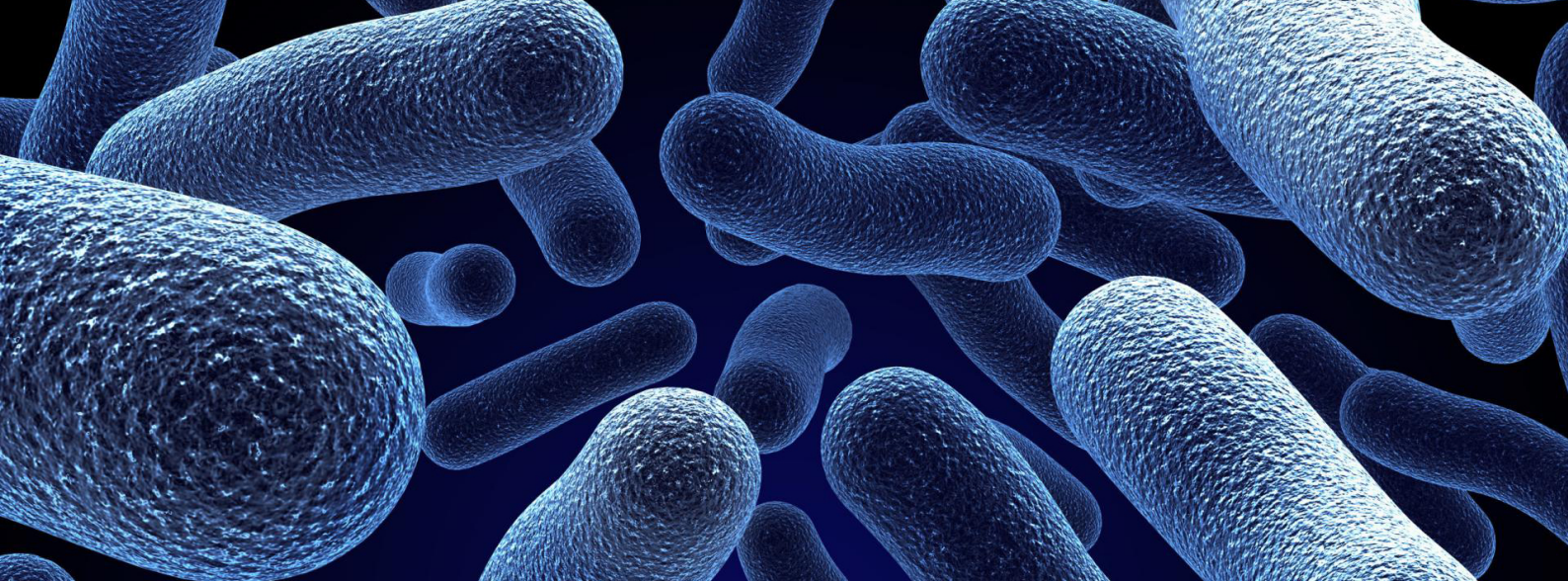


## Índice general

<b>1</b>	<b>Estequiometría del crecimiento microbiano</b> .....	<b>5</b>
1.1	Ecuación de crecimiento microbiano	5
1.2	Concepto de Carbono mol	7
1.3	Concepto de Grado de reducción	9
1.4	Rendimientos	12
1.5	Sustrato limitante del crecimiento	14
1.6	Balances aplicados a la ecuación de crecimiento microbiano	15
1.6.1	Balance de carbono .....	15
1.6.2	Balance de nitrógeno .....	16
1.6.3	Balance de grado de reducción .....	16
1.6.4	Balance energético .....	17
1.7	Consistencia de datos experimentales	18
1.8	Conclusiones finales	18
<b>2</b>	<b>Cinética del crecimiento microbiano</b> .....	<b>19</b>
2.1	Velocidades en bioprocesos	19
2.1.1	Velocidades específicas .....	19
2.1.2	Velocidades volumétricas .....	20
2.2	Relación entre velocidades y rendimientos	22
2.3	Velocidad específica de crecimiento	24
2.3.1	Influencia del tipo de microorganismo en $\mu_{max}$ .....	25
2.3.2	Influencia de la temperatura en $\mu_{max}$ .....	26
2.3.3	Influencia del pH en $\mu_{max}$ .....	27
2.3.4	Influencia de la composición del medio de cultivo en $\mu_{max}$ .....	28
2.4	Conclusiones finales	28

<b>3</b>	<b>Bibliografía de referencia .....</b>	<b>31</b>
----------	-----------------------------------------	-----------



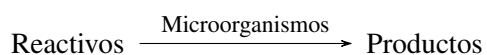


# 1. Estequiometría del crecimiento microbiano

En este capítulo abordaremos en forma general conceptos estequiométricos aplicados al crecimiento microbiano y la formación de productos de interés biotecnológico. El entendimiento de estos conceptos nos permitirá responder preguntas cotidianas tales como: ¿Cuánto etanol puedo producir a partir de un mosto de uva de determinada cantidad de azúcares fermentables?, ¿Cuánta sacarosa debo adicionar para carbonatar una botella de cerveza?, ¿Cuánto calor genera una fermentación alcohólica?, entre otras. Se pretende que el Alumno al finalizar este capítulo no solamente adquiera las herramientas indispensables para calcular rendimientos, sino que también desarrolle criterio para la toma de decisiones sobre los procesos biotecnológicos con los que puedan estar en contacto durante su vida profesional.

## 1.1 Ecuación de crecimiento microbiano

A lo largo de su carrera, el Alumno de Ingeniería Química aprende a describir por medio de reacciones los fenómenos químicos que los rodean. Los procesos biológicos son fundamentalmente procesos químicos en los cuales intervienen agentes biológicos como son los microorganismos. De esta forma, un bioproceso puede describirse en forma sencilla como una reacción química, de la siguiente manera:



En un bioproceso, los reactivos son los nutrientes que el microorganismo necesita para crecer (reproducirse) y mantenerse vivo. Ya se ha hablado previamente en la materia sobre nutrición microbiana, con lo cual sabemos que el microorganismo requiere una fuente de carbono (FC), una fuente de energía (FE), una fuente de nitrógeno (FN), macro y micronutrientes, O<sub>2</sub> (en caso de ser un microorganismo aeróbico), factores de crecimiento, etc. Todo el tratamiento que haremos en este apunte será para microorganismos quimioorganótrofos, esto es, microorganismos que utilizan un compuesto orgánico como fuente de carbono y energía (FCE).

En lo que respecta a los productos, uno de los más importantes para nosotros será la masa

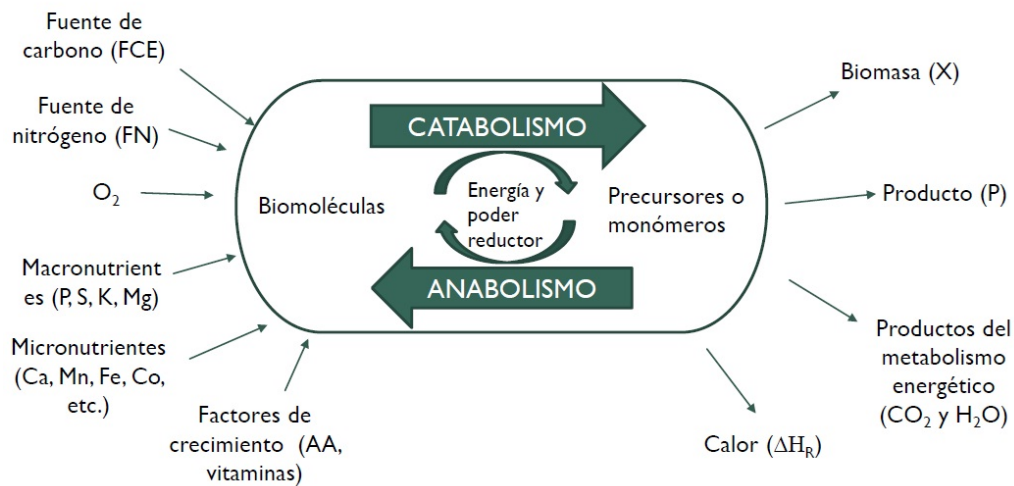
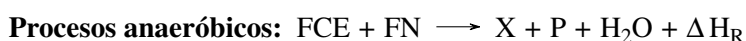
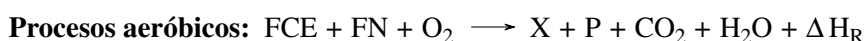


Figura 1.1: Representación del metabolismo del un microorganismo quimioheterótrofo

de microorganismo que se generan por reproducción celular, a la cual denominaremos de ahora en más BIOMASA y lo representaremos con la letra X. Además, tendremos productos ligados al metabolismo energético, como lo son el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en un metabolismo puramente oxidativo, o bien, un compuesto orgánico en un metabolismo fermentativo. Además, los microorganismos dependiendo del medio y de las condiciones de cultivo pueden generar productos no ligados al metabolismo energético, como ser alcoholes, ácidos orgánicos, lípidos, polímeros, antibióticos, etc. En forma genérica, designaremos a estos productos con la letra P. Finalmente, parte de la FCE metabolizada por los microorganismos se libera como calor, el cual representaremos como  $\Delta H_R$ . Mas adelante en este capítulo se tratará sobre cómo cuantificar el calor liberado durante un determinado bioproceso.

La biotransformación que acabamos de describir no ocurre espontáneamente, sino que es mediada por una serie de reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo de un microorganismo. En la Fig. 1.1 podemos ver como los reactivos y productos de un bioproceso se relacionan con el metabolismo microbiano. Podríamos considerar al microorganismo como un microbiorreactor donde los sustratos se asimilan a partir de reacciones catabólicas para poder obtener energía (ATP) y poder reductor (NAD(P)H). Éstos son necesario para llevar a cabo las reacciones anabólicas para producir los precursores metabólicos o monómeros que darán lugar a Biomoléculas, y con ellas, a un nuevo individuo (biomasa) y productos asociados al metabolismo. Con el advenimiento de la era genómica, cada vez tenemos un mayor entendimiento de la maquinaria intracelular de diferentes microorganismos empleados en biotecnología. Sin embargo, este marco conceptual escapa a los propósitos de este curso, y no son requeridos, *a priori*, para el manejo macroscópico de una planta biotecnológica. Es por ello, que a los propósitos de simplificar el desarrollo matemático consideraremos al microorganismo como una caja negra y solo tendremos en cuenta el balance extracelular del bioproceso, o sea el balance de componentes que se intercambian con el medio de cultivo (Fig. 1.2).

Luego, en base al modelo de caja negra podemos expresar la ecuación anterior de la siguiente manera:



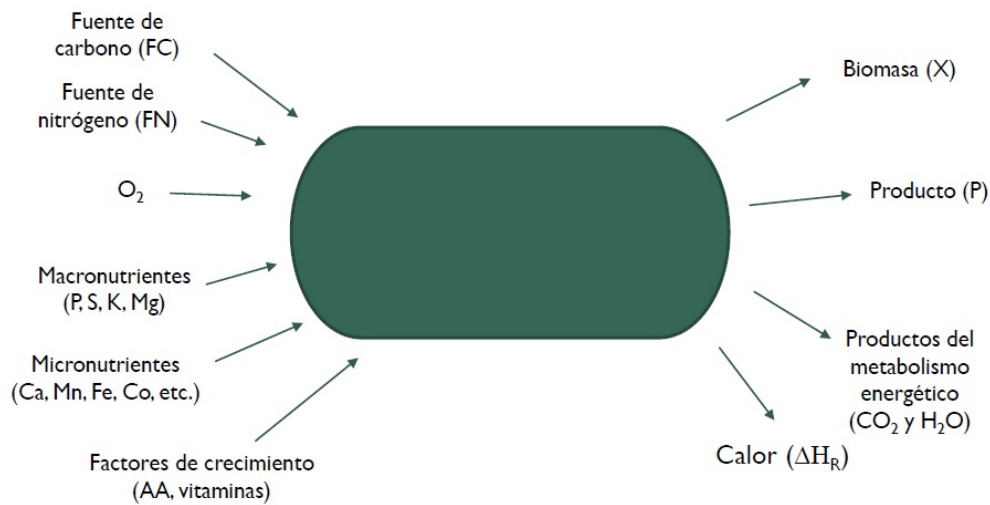
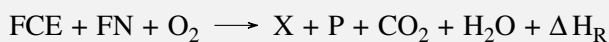


Figura 1.2: Representación del modelo de caja negra para el estudio de la estequiometría microbiana

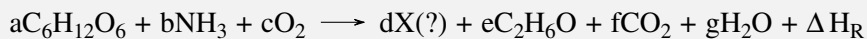
Como puede observarse en las ecuaciones anteriores, los macro y micronutrientes, así como los factores de crecimiento no se incluyen en las ecuaciones de crecimiento microbiano. Esto no implica que no sean importante, sino que son componentes cuantitativamente minoritarios en la composición microbiana y, por ende, tienen poco efecto en el tratamiento matemático que vamos a desarrollar. El alumno debe tener en cuenta que si bien no se expresan en la ecuación de crecimiento, los componentes minoritarios del medio de cultivo son importantes para el desarrollo microbiano.

**Ejercicio 1.1.1 — Ecuación estequiométrica.** Escribir la ecuación de crecimiento microbiano de una levadura creciendo aeróbicamente en glucosa como FCE y amoníaco como FN. Se sabe que en estas condiciones de cultivo se produce biomasa, etanol,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

Solución: Debemos plantear la ecuación de crecimiento teniendo en cuenta las fórmulas moleculares de los reactivos (nutrientes) y de los productos del metabolismo microbiano. Luego,



Para nuestro sistema en particular, tenemos:



Como puede apreciarse en este ejercicio, no podemos calcular los coeficientes estequiométricos de la reacción sin conocer la fórmula molecular de la biomasa. En el siguiente capítulo abordaremos este problema para lograr plantear adecuadamente la ecuación estequiométrica de crecimiento microbiano.

## 1.2 Concepto de Carbono mol

El concepto de Carbono mol es muy relevante a la hora de escribir la ecuación estequiométrica de crecimiento microbiano y realizar los correspondientes balances para el cálculo de los rendimientos.

**Definición 1.2.1 — Carbono mol.** Se define como Carbono mol (C-mol) a la cantidad de un compuesto químico que contiene un átomo gramo de C.

De la definición anterior surge que se puede calcular el C-mol de cualquier compuesto carbonado de composición elemental conocida. Para ello, debe expresarse dicho compuesto en su fórmula mínima (aquella que contiene 1 at-g de C) y calcular el peso de dicha fórmula mínima. En la Tabla 1.1 se detallan algunos ejemplos.

Compuesto	Fórmula molecular	Cmol	Peso (g)/Cmol
Ácido oxálico	$C_2H_2O_4$	$CHO_2$	45
Ácido fórmico	$CH_2O_2$	$CH_2O_2$	46
Ácido acético	$C_2H_4O_2$	$CH_2O$	30
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	$CH_2O$	30
Glicerol	$C_3H_8O_3$	$CH_{2,67}O$	30,67
Etanol	$C_2H_6O$	$CH_3O_{0,5}$	23
Metanol	$CH_4O$	$CH_4O$	32
Metano	$CH_4$	$CH_4$	16
Isoleucina	$C_6H_{13}O_2N$	$CH_{2,17}O_{0,33}N_{0,17}$	21,83
Alanina	$C_3H_7O_2N$	$CH_{2,33}O_{0,67}N_{0,33}$	29,67

Tabla 1.1: Cálculo de Cmol de diferentes compuestos orgánicos

Como vimos en el transcurso de esta asignatura, los microorganismos están compuestos por biomoléculas, con lo cual no es disparatado pensar que podemos hallar una fórmula del Cmol para la biomasa. Para ello, tendríamos que determinar la composición elemental para cada microorganismo en particular. Esto demandaría mucho tiempo y recursos, sin embargo, su estimación es fundamental para la incorporación de la biomasa en la ecuación estequiométrica de crecimiento y para el cálculo de los coeficientes estequiométricos. Por fortuna, a partir de estudios previos se ha observado que la composición de un microorganismo no se modifica significativamente en el transcurso de un cultivo, e incluso, es muy similar entre diferentes tipos de microorganismos, por ende podemos definir un microorganismo “estándar” como aquel cuya composición elemental es 46,5 % p/p de C, 6,94 % p/p de H, 31 % p/p de O, 10,85 % p/p de N y 5 % p/p de sales. A partir de esta composición, podemos fácilmente arribar a la conclusión de que la fórmula de 1 Cmol de biomasa ‘estándar’ es  $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$  con un peso de 25,9 g/Cmol. Si bien es conveniente emplear siempre que se pueda la fórmula específica del microorganismo con el que estamos trabajando, no se comenten grandes errores al emplear esta fórmula ‘estándar’ en ausencia de datos experimentales.

**Ejercicio 1.2.2 — Determinación de Cmol de un microorganismo.** Calcular el peso de 1 C-mol de una levadura cuya composición elemental es: 47 % p/p de C, 7,2 % p/p, de H, 33,4 % p/p de O, y 8,9 % p/p de N. Se determinó que el microorganismo tiene un 3,5 % de sales.

Solución: A partir de la composición elemental en % p/p debemos hallar la cantidad de at-g de cada elemento por gramo de biomasa.

$$C = \frac{47gC}{100gX} \times \frac{1atgC}{12gC} = 0,0392 \frac{atgC}{gX}$$



$$H = \frac{7,2gH}{100gX} \times \frac{1atgH}{1gH} = 0,072 \frac{atgH}{gX}$$

$$O = \frac{33,4gO}{100gX} \times \frac{1atgO}{16gO} = 0,021 \frac{atgO}{gX}$$

$$N = \frac{8,9gN}{100gX} \times \frac{1atgN}{14gN} = 0,0064 \frac{atgN}{gX}$$

Para expresar todo en base a 1 atg de C, debemos dividir cada elemento por 0.0392 atg de C. De este modo la fórmula del Cmol de esta levadura será igual a:  $CH_{1,84}O_{0,53}N_{0,16}$ . Luego, el peso de 1 Cmol de esta levadura será igual a:

$$Cmol \text{ de la levadura} = \frac{1 \times 12g + 1,84 \times 1g + 0,53 \times 16g + 0,16 \times 14g}{(1 - 0,035)}$$

$$Cmol \text{ de la levadura} = 25,45 \frac{gX}{CmolX}$$

### 1.3 Concepto de Grado de reducción

Otro concepto de gran importancia a la hora de considerar la energía puesta en juego en un bioprocesos es el Grado de reducción.

**Definición 1.3.1 — Grado de reducción.** Se define como Grado de reducción ( $\gamma$ ) a los equivalentes de electrones disponibles en un C-mol de compuesto que son transferidos al  $O_2$  en una reacción de oxidación, sujeto a determinados grados de referencia ( $CO_2$ ,  $H_2O$  y un compuesto nitrogenado en caso que corresponda).

De acuerdo a la definición anterior, para calcular el  $\gamma$  de un compuesto es necesario plantear la ecuación de oxidación química de un C-mol de dicho compuesto. Si empleamos un compuesto genérico, podemos plantear la ecuación de oxidación de la siguiente manera:

- Combustión completa a  $CO_2$ ,  $H_2O$  y  $NH_3$ 

$$CH_mO_lN_k + nO_2 \longrightarrow CO_2 + wH_2O + kNH_3 + \Delta H_C$$
- Combustión completa a  $CO_2$ ,  $H_2O$  y  $N_2$ :
 
$$CH_mO_lN_k + nO_2 \longrightarrow CO_2 + wH_2O + pN_2 + \Delta H_C$$

En ambos casos, el  $\gamma$  del compuesto genérico  $i$  se calcula como:

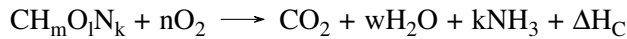
$$\gamma_i = 4 \times n$$

Sin embargo, el valor de 'n' dependerá de las referencias consideradas, específicamente del compuesto nitrogenado tomado como referencia. Luego, el valor de  $\gamma_i$  dependerá también de la referencia considerada. En este punto es importante detenernos a deducir en que unidades se

encuentra expresada esta magnitud. Por un lado, '4' son los equivalentes de electrones puestos en juego para que cada mol de oxígeno pueda pasar de un estado de oxidación de 0 en su forma molecular a -2. Por otro lado, 'n' son los moles de oxígeno por carbono mol del compuesto i. De este análisis surge que las unidades de  $\gamma_i$  son equivalentes de electrones por Cmol del compuesto en cuestión [eq. e<sup>-</sup>/Cmol].

Tratemos ahora de encontrar una expresión matemática que nos permita calcular rápidamente el  $\gamma_i$  de cualquier compuesto sin necesidad de plantear la reacción de oxidación y balancear dicha ecuación. Para ello, haremos uso de los balances elementales y encontraremos una expresión para 'n' para los diferentes estados de referencia considerados.

★ Estados de referencia: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>:



Balance de C:  $1 = 1$

Balance de H:  $m = 2w + 3k$

Balance de O:  $l + 2n = 2 + w$

Balance de N:  $k = k$

De estos balances nos queda que:

$$n = 1 + \frac{1}{2}w - \frac{1}{2}l$$

Por otro lado:

$$w = \frac{1}{2}m - \frac{3}{2}k$$

Si reemplazamos la expresión para w en la ecuación anterior:

$$n = 1 + \frac{1}{4}m - \frac{3}{4}k - \frac{1}{2}l$$

En conclusión, para los sistemas de referencias empleados:

$$\gamma_i^{NH_3} = 4 \times n = 4 + m - 3k - 2l$$

★ Estados de referencia: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>:



Balance de C:  $1 = 1$

Balance de H:  $m = 2w$

Balance de O:  $l + 2n = 2 + w$

Balance de N:  $k = 2p$

De estos balances nos queda que:

$$n = 1 + \frac{1}{2}w - \frac{1}{2}l$$

Por otro lado:

$$w = \frac{1}{2}m$$

Si reemplazamos la expresión para w en la ecuación anterior:

$$n = 1 + \frac{1}{4}m - \frac{1}{2}l$$

En conclusión, para los sistemas de referencias empleados:

$$\gamma_i^{N_2} = 4 \times n = 4 + m - 2l$$

En la Tabla 1.2 se presenta el cálculo del  $\gamma$  para diferentes compuestos orgánicos. Como puede apreciarse en la misma, los compuestos seleccionados no contienen nitrógeno en su composición por lo que el cálculo de  $\gamma$  es indiferente de la referencia del compuesto nitrogenado que se tome. En caso de que el compuesto contenga nitrógeno es necesario considerar en el cálculo de  $\gamma$  el compuesto nitrogenado que se toma como referencia. Veremos mas adelante (Sección 1.6.3) de qué depende la elección de dicha referencia .

Compuesto	Cmol	Reacción	$\gamma$	$\Delta H_c$ ( $\frac{Kcal}{Cmol}$ )	$\Delta H_c/\gamma$
Ác. oxálico	CHO <sub>2</sub>	CHO <sub>2</sub> + $\frac{1}{4}$ O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + $\frac{1}{4}$ H <sub>2</sub> O	1	29,4	29,4
Ác. fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + $\frac{1}{2}$ O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	2	61	30,5
Ác. acético	CH <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	4	104,8	26,2
Glucosa	CH <sub>2</sub> O	CH <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	4	111,9	28
Etanol	CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub>	CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub> + $\frac{3}{2}$ O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + $\frac{3}{2}$ H <sub>2</sub> O	6	163,8	27,3
Metano	CH <sub>4</sub>	CH <sub>4</sub> + 2 O <sub>2</sub> $\rightarrow$ CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	8	213,4	26,7

Tabla 1.2: Grado de reducción de diferentes compuestos orgánicos

En Tabla 1.2 también se presentan los calores de combustión  $\Delta H_C$  para cada reacción. Éste es el calor liberado en la oxidación completa de 1 Cmol de dicho compuesto, por ende tiene unidades de Energía por Cmol del compuesto. En la última columna puede observarse que la relación entre el calor liberado durante la combustión del compuesto y el grado de reducción del compuesto es prácticamente constante e igual a:

$$\Delta H_c/\gamma \approx 27,5 \frac{Kcal}{eq.e^-} \approx 115 \frac{KJ}{eq.e^-}$$

El hecho de que esta relación sea prácticamente constante me permite concluir que  $\gamma$  es una buen indicio de la energía contenida en el compuesto. Como veremos mas adelante, esta relación también resulta muy útil para estimar el calor liberado en un proceso aeróbico.

**Ejercicio 1.3.2 — Determinación de Grado de reducción de la biomasa estándar.** Calcular el grado de reducción de la biomasa estándar con NH<sub>3</sub> como referencia y con N<sub>2</sub> como referencia.

Solución: Calcularemos el  $\gamma_X$  por definición y empleando la fórmula que dedujimos anteriormente.

★ Estados de referencia: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>

Por medio de la definición:



$$\gamma_X^{NH_3} = 4 \times n = 4 \times 1,05 = 4,2$$

Por medio de la fórmula:

$$\gamma_X^{NH_3} = 4 + m - 2l - 3k = 4 + 1,8 - 2 \times 0,5 - 3 \times 0,2 = 4,2$$

★ Estados de referencia: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub>

Por medio de la definición:



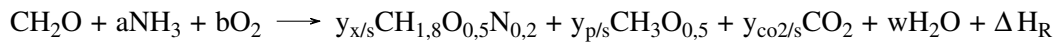
$$\gamma_X^{\text{N}_2} = 4 \times n = 4 \times 1,2 = 4,8$$

Por medio de la fórmula:

$$\gamma_X^{\text{N}_2} = 4 + m - 2l = 4 + 1,8 - 2 \times 0,5 = 4,8$$

## 1.4 Rendimientos

En el Capítulo 1.1 aprendimos a plantear el crecimiento microbiano como una reacción química, aplicando el modelo de caja negra. La dificultad que surgió en ese momento fue lograr expresar la biomasa como un compuesto químico para poder balancear la ecuación estequiométrica. Sin embargo, a partir de la introducción del concepto de C-mol (Capítulo 1.2), podemos reescribir la reacción de crecimiento microbiano, utilizando las fórmulas mínimas de cada compuesto y expresando todo en función de 1 Cmol de FCE, que simbolizamos con la letra S. Para ello, consideraremos el ejemplo de una levadura (biomasa estándar) creciendo en aerobiosis con glucosa (FCE), amoníaco (FN), y demás nutrientes necesarios. Se sabe que esta levadura en las condiciones planteadas produce además etanol. Luego, la ecuación estequiométrica puede plantearse de la siguiente manera:



donde,

a: Cantidad de FN consumida por Cmol de FCE [molFN/CmolS].

b: Cantidad de O<sub>2</sub> consumido por Cmol de FCE [molO<sub>2</sub>/CmolS].

y<sub>x/s</sub>: Cantidad de biomasa producida por Cmol de FCE [CmolX/CmolS].

y<sub>p/s</sub>: Cantidad de producto producido por Cmol de FCE [CmolP/CmolS].

y<sub>co2/s</sub>: Cantidad de CO<sub>2</sub> liberado por Cmol de FCE [molCO<sub>2</sub>/CmolS].

w: cantidad de agua producida por Cmol de FCE [molH<sub>2</sub>O/CmolS].

ΔH<sub>R</sub>: cantidad de calor liberado por Cmol de FCE [kJ/CmolS].

Como podemos apreciar en la ecuación anterior, los coeficientes estequiométricos pueden expresarse como rendimientos, de este modo, y<sub>x/s</sub> es el rendimiento en biomasa, y<sub>p/s</sub> es el rendimiento en producto (en este caso etanol), y así sucesivamente. Si bien no hemos tenido en cuenta aún el tiempo en el cual transcurre esta reacción, sabemos que estas las concentraciones de los nutrientes y productos van a evolucionar, de alguna manera, en el transcurso del cultivo. Consideremos el ejemplo mas sencillo de cultivo en el cual preparamos y esterilizamos un medio de cultivo con todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo e inoculamos en esterilidad la cepa que nos interesa producir (biomasa). Si no intervenimos más en el proceso (sistema de cultivo discontinuo o batch), al final del cultivo veremos que las cantidades que colocamos al inicio de cada nutriente disminuyen, e incluso aparecerán productos derivados del metabolismo microbiano y habrá un incremento de biomasa resultante de la reproducción celular. Si tomamos el inicio y el final del cultivo como puntos de referencia, podemos calcular los rendimientos anteriores en función de las medidas experimentales de las concentraciones de las variables que intervienen en el mismo, de la siguiente manera:



$$y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{FCE consumida}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

$$y_{p/s} = \frac{\text{Producto producido}}{\text{FCE consumida}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f}{S_0 - S_f}$$

De igual manera que con los productos de la reacción, se puede calcular cualquier rendimiento de la ecuación estequiométrica, incluso el de los sustratos. Por ejemplo, si queremos calcular el rendimiento 'a' podríamos hacerlo de manera análoga al rendimiento en biomasa:

$$a = \frac{\text{FN consumida}}{\text{FCE consumida}} = \frac{\Delta N}{\Delta S} = \frac{N_0 - N_f}{S_0 - S_f}$$

En el caso particular del  $O_2$  y el  $CO_2$ , a diferencia del resto de los componentes del medio de cultivo, tienen muy baja solubilidad en el medio de cultivo (fase líquida), con lo cual se intercambian todo el tiempo con la fase gaseosa. Por ello, no podemos hablar de un incremento absoluto de estos componentes. Mas adelante veremos como podemos calcular experimentalmente los rendimientos  $b$  y  $y_{CO_2/s}$ , por ahora los definiremos de la siguiente manera:

$$b = \frac{O_2 \text{ consumido}}{\text{FCE consumida}} = \frac{O_2 \text{ total consumido}}{\Delta S} = \frac{O_2 \text{ total}}{S_0 - S_f}$$

$$y_{CO_2/s} = \frac{CO_2 \text{ producido}}{\text{FCE consumida}} = \frac{CO_2 \text{ total producido}}{\Delta S} = \frac{CO_2 \text{ total}}{S_0 - S_f}$$

Además de los rendimientos que se derivan de la ecuación estequiométrica de crecimiento podemos plantear rendimientos diferentes en función de otros sustratos. Por ejemplo, para saber cuanta biomasa se genera a partir de la FN podemos calcular el siguiente rendimiento:

$$y_{x/n} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{FN consumida}} = \frac{\Delta X}{\Delta N} = \frac{X_f - X_0}{N_0 - N_f}$$

Es posible también calcular cualquier rendimiento como cociente de otros rendimientos. Como ejemplo, expresemos el rendimiento  $y_{x/n}$  a partir de los rendimientos conocidos  $y_{x/s}$  y 'a' :

$$y_{x/n} = \frac{y_{x/s}}{a}$$

Finalmente, cuando calculamos los rendimientos experimentales en un sistema batch, es usual que las concentraciones se encuentren en gramos del compuesto por litro del medio de cultivo. Los rendimientos que hemos visto hasta ahora pueden expresarse en las unidades que queramos, lo importante es tener siempre presente que los rendimientos que incorporamos en la ecuación estequiométrica de crecimiento están en Cmol o mol (en el caso de sustancias que no tienen C), ya que se tratan de los coeficientes estequiométricos de las fórmulas mínimas de los compuestos. Bastará entonces con hacer un simple pasaje de unidades para expresar el rendimiento en diferentes unidades.

**Ejercicio 1.4.1 — Expresar rendimientos en diferentes unidades.** Calcular el rendimiento en biomasa en  $\text{Cmol}_X/\text{Cmol}_S$ , sabiendo que al final del cultivo batch se obtuvieron  $6,5 \text{ g/l}$  de biomasa seca, partiendo de un inóculo de  $0,5 \text{ g/l}$ , y se consumieron  $15 \text{ g/l}$  de glucosa (única FCE).

Solución: Calculamos primero el rendimiento en las unidades medidas experimentalmente.

$$y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} = \frac{6,5 \text{ g}_X/\text{l} - 0,5 \text{ g}_X/\text{l}}{15 \text{ g}_S/\text{l}} = 0,4 \frac{\text{g}_X}{\text{g}_S}$$

Luego, llevamos a cabo el pasaje de unidades:

$$y_{X/S} = 0,4 \frac{\text{g}_X}{\text{g}_S} \times \frac{30 \text{ g}_S}{1 \text{ Cmol}_S} \times \frac{1 \text{ Cmol}_X}{25,9 \text{ g}_X} = 0,46 \frac{\text{Cmol}_X}{\text{Cmol}_S}$$

## 1.5 Sustrato limitante del crecimiento

Como Ingenieros Químicos en formación ya están familiarizados con el término de sustrato limitante de una reacción química. Del forma análoga podemos definir el sustrato limitante del crecimiento de la siguiente manera:

**Definición 1.5.1 — Sustrato limitante del crecimiento microbiano.** Se define como tal al sustrato que condiciona estequiométricamente la cantidad de biomasa que se va a producir.

De la definición anterior se desprende que la limitación no necesariamente tiene que ver con la cantidad de dicho compuesto en el medio de cultivo, sino con los requerimientos nutricionales del microorganismo. Normalmente los sustratos limitantes del crecimiento son la FCE o la FN, ya que el resto de los componente o bien se agregan en exceso o incluso se encuentran como impurezas de otros compuestos, como es el caso de los microelementos. Sin embargo es fundamental a la hora de diseñar un medio de cultivo conocer los requerimientos nutricionales del microorganismo a cultivar ya que puede limitarse en cualquier componente del medio de cultivo como ser un microelemento, una vitamina, un aminoácido, etc.

**Ejercicio 1.5.2 — Sustrato limitante del crecimiento microbiano.** Determinar cual es el sustrato limitante del crecimiento aeróbico de una bacteria en un medio de cultivo con  $10 \text{ g/l}$  de glucosa como FCE y  $2 \text{ g/l}$  de amoníaco como FN. Se sabe de estudios previos que el  $y_{x/s}$  es de  $0,45 \text{ g/g}$ . Considerar biomasa estándar y que no hay formación de producto.

Solución: La primer consideración que debemos hacer es que uno de los dos sustratos (glucosa o amoníaco) es el sustrato limitante y no cualquier otro sustrato del medio de cultivo. Además, consideraremos que el cultivo se realiza en sistema batch o discontinuo, ya que es el único sistema que conocemos por el momento. Existen diversas formas de encarar este problema, aquí presentaremos una de las más fáciles de analizar pero invitamos al alumno que explore otras alternativas. Lo primero que haremos es escribir la ecuación estequiométrica que representa el bioproceso planteado:



Uno de los caminos mas sencillos consiste en calcular la cantidad de biomasa que se obtiene en el proceso considerando que uno de ellos (FCE o FN) es el limitante y compararla con el

que tendría si el otro nutriente es el limitante. Como puede verse es un estudio teórico previo al experimento. Para calcular la biomasa haremos uso del concepto de rendimientos. Luego,

- Suponemos que la FCE es la limitante del crecimiento:

$$y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = 0,45 \frac{gX}{gS}$$

Si consideramos que es la FCE es la limitante significa que al final del cultivo la concentración de ese nutriente es igual a 0 ( $S_f = 0$ ) y por ende  $\Delta S = S_0$ , entonces:

$$\Delta X_1 = y_{x/s} \times \Delta S = 0,45 \frac{gX}{gS} \times 10 \frac{gS}{l} = 4,5 \frac{gX}{l}$$

- Suponemos que la FN es la limitante del crecimiento:

En este caso, el problema no nos brinda información sobre el rendimiento en biomasa de la FN. Sin embargo, como la biomasa es el único producto nitrogenado en esta ecuación podemos obtener este rendimiento simplemente observando la fórmula de biomasa estándar en la ecuación estequiométrica. De dicha fórmula podemos determinar que para producir 1 Cmol de biomasa se requieren 0,2 atg de N, o lo que es lo mismo, podemos producir 5 Cmol de biomasa a partir de 1 atg de N. A partir de esta información, deducimos el rendimiento  $y_{x/n}$ , de la siguiente manera:

$$y_{x/n} = 5 \frac{CmolX}{atgN} \times \frac{1atgN}{molFN} \times \frac{1molFN}{17gFN} \times \frac{25,9gX}{CmolX} = 7,61 \frac{gX}{gFN}$$

Si consideramos que la FN es la limitante significa que al final del cultivo la concentración de ese nutriente es igual a 0 ( $N_f = 0$ ) y por ende  $\Delta N = N_0$ , entonces:

$$\Delta X_2 = y_{x/n} \times \Delta N = 7,61 \frac{gX}{gFN} \times 2 \frac{gFN}{l} = 15,22 \frac{gX}{l}$$

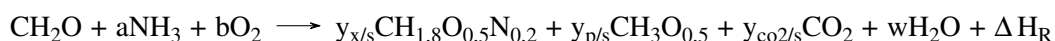
Si observamos los  $\Delta X$  en ambos casos podemos ver que se genera menor cantidad de biomasa en el primer caso. Por lo tanto es correcto decir que la FCE es la limitante del crecimiento microbiano en este ejemplo.

## 1.6 Balances aplicados a la ecuación de crecimiento microbiano

En esta sección presentaremos todos los balances que podemos derivar de la ecuación de crecimiento microbiano. Para ellos utilizaremos el ejemplo de la Sección 1.4.

### 1.6.1 Balance de carbono

Dada la siguiente reacción de crecimiento microbiano:



Planteamos el balance elemental del carbono:

$$1 = y_{x/s} + y_{p/s} + y_{co2/s}$$

Como podemos ver en la ecuación anterior, el balance de carbono está simplificado gracias a que todos los compuestos están expresados en su fórmula de Cmol y además pusimos todo referido a 1 Cmol de FCE, en este caso glucosa.

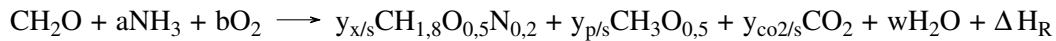
Podemos interpretar este balance de la siguiente manera: 1 Cmol de FCE se utiliza como fuente de carbono en parte para producción de biomasa ( $y_{x/s}$ ), en parte para la producción de producto

( $y_{p/s}$ ) y en parte se libera como  $\text{CO}_2$  ( $y_{\text{CO}_2/s}$ ). Dicho de otra manera,  $y_{x/s}$  es la fracción de FCE que se utiliza como FC para la producción de biomasa,  $y_{p/s}$  es la fracción de FCE que se utiliza como FC para la producción de un producto (en el ejemplo etanol) y  $y_{\text{CO}_2/s}$  es la fracción de FCE que se libera como  $\text{CO}_2$  gaseoso.

**Es de fundamental importancia tener en cuenta que como el balance se deriva de la ecuación expresada en Cmol, este balance es válido únicamente si se expresan los rendimientos en Cmol.**

### 1.6.2 Balance de nitrógeno

Dada la siguiente reacción de crecimiento microbiano:



Planteamos el balance elemental de nitrógeno:

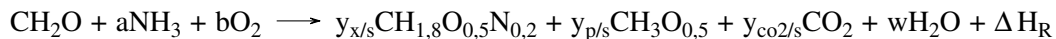
$$1 \times a = y_{x/s} \times 0,2$$

**La ecuación anterior es válida siempre y cuando el único destino de la FN sea la biomasa y los rendimiento se expresen en Cmol.** El número que precede al coeficiente 'a' depende de la cantidad de nitrógenos que tenga la FN, por ejemplo, si la FN es  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el término de la izquierda se transforma en '2a'. Finalmente, si hay un producto nitrogenado o bien la FCE que contiene nitrógeno, hay que incorporarlos al balance ya sea en el término de los sustratos o de los productos.

### 1.6.3 Balance de grado de reducción

En la Sección 1.3 aprendimos el concepto de  $\gamma$  y como se calcula. Vimos que para calcularlo es necesario establecer ciertas referencias, normalmente  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y un compuesto nitrogenado. En esta Sección plantearemos el balance de los  $\gamma$  de los compuestos que intervienen en la ecuación del crecimiento microbiano. Para ello, estableceremos las referencias mas utilizadas y discutiremos como elegir la referencia que más me convenga para resolver el problema.

Dada la siguiente reacción de crecimiento microbiano:



Planteamos el balance de grado de reducción, tomando como referencia  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ :

$$\gamma_S^{\text{N}_2} + a\gamma_N^{\text{N}_2} - 4b = y_{x/s}\gamma_X^{\text{N}_2} + y_{p/s}\gamma_P^{\text{N}_2}$$

Como podemos ver en la ecuación anterior, si bien los  $\gamma$  de los compuestos se calculan fácilmente, para calcular cualquiera de los parámetros debemos conocer al menos 3 parámetros mas. Para disminuir la cantidad de variables a medir experimentalmente, podemos elegir racionalmente la referencia nitrogenada, ya que si planteamos la FN como referencia en el balance, podemos simplificar el balance y no hace falta *a priori* medir ese compuesto. Así, si en el ejemplo anterior planteamos el balance con  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$  como referencia:

$$\gamma_S^{\text{NH}_3} - 4b = y_{x/s}\gamma_X^{\text{NH}_3} + y_{p/s}\gamma_P^{\text{NH}_3}$$

Reordenamos las variables para que quede expresado en forma similar al balance de carbono:

$$1 = y_{x/s} \frac{\gamma_X^{\text{NH}_3}}{\gamma_S^{\text{NH}_3}} + y_{p/s} \frac{\gamma_P^{\text{NH}_3}}{\gamma_S^{\text{NH}_3}} + \frac{4b}{\gamma_S^{\text{NH}_3}}$$

Esta ultima ecuación también se escribe como:

$$1 = \eta + \xi + \varepsilon$$

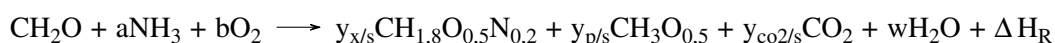


En forma análoga al balance de carbono podemos interpretar este balance de la siguiente manera: 1 Cmol de FCE se utiliza como fuente de energía en parte para producción de biomasa ( $\eta$ ), en parte para la producción de producto ( $\xi$ ) y en parte para el metabolismo energético ( $\epsilon$ ). Dicho de otra manera,  $\eta$  es la fracción de FCE que se utiliza como FE para la producción de biomasa,  $\xi$  es la fracción de FCE que se utiliza como FE para la producción de un producto y  $\epsilon$  es la fracción de FCE que se libera como calor en un metabolismo netamente oxidativo.

**En este balance, como en los casos anteriores, los rendimientos se expresan en Cmol al igual que los  $\gamma$ , los cuales están expresados por Cmol de compuesto.**

#### 1.6.4 Balance energético

El balance energético o entálpico del proceso está muy ligado al balance de grado de reducción, porque como ya hemos visto los calores de combustión de los compuestos guardan una estrecha relación con los  $\gamma$  de dichos compuestos. De forma análoga al balance de grado de reducción, necesitaremos establecer ciertas referencias. En este caso no es tan sencillo como elegir la FN como el compuesto nitrogenado de referencia, ya que dependemos de que los calores de combustión tabulados en bibliografía tengan las mismas referencias. Normalmente los calores de combustión tabulados están referidos al  $N_2$ , con lo cual, tomaremos este compuesto nitrogenado como referencia para el balance. Dada la siguiente reacción de crecimiento microbiano:



Planteamos el balance energético, tomando como referencia  $CO_2$ ,  $H_2O$  y  $N_2$ :

$$\Delta H_S + a\Delta H_{NH_3} = y_{x/s}\Delta H_X + y_{p/s}\Delta H_P + \Delta H_R$$

Este balance nos dice que la energía contenida en los sustratos ( $\Delta H_S + a\Delta H_{NH_3}$ ) en parte queda retenida en la biomasa ( $y_{x/s}\Delta H_X$ ), en parte en el producto ( $y_{p/s}\Delta H_P$ ) y parte se libera como calor ( $\Delta H_R$ ).

En la Sección 1.3 vimos que el calor de combustión de un compuesto guarda una relación prácticamente constante con el  $\gamma$  de dicho compuesto.

$$\Delta H_c/\gamma \approx 115 \frac{KJ}{eq.e^-}$$

Recordemos el balance de  $\gamma$  para la misma ecuación con las mismas referencias (Ver subsección 1.6.3):

$$\gamma_S^{N_2} + a\gamma_N^{N_2} - 4b = y_{x/s}\gamma_X^{N_2} + y_{p/s}\gamma_P^{N_2}$$

Multiplicamos este balance por  $115 \frac{KJ}{eq.e^-}$  :

$$115 \times \gamma_S^{N_2} + a115 \times \gamma_N^{N_2} - 115 \times 4b = y_{x/s}115 \times \gamma_X^{N_2} + y_{p/s}115 \times \gamma_P^{N_2}$$

Teniendo en cuenta la relación entre el calor de combustión y el  $\gamma$  de un compuesto, la ecuación anterior nos queda:

$$\Delta H_S + a\Delta H_{NH_3} - 115 \times 4b = y_{x/s}\Delta H_X + y_{p/s}\Delta H_P$$

Si comparamos el balance energético con la ecuación anterior, llegamos a la conclusión que:

$$115 \times 4b = \Delta H_R$$

Esta última ecuación nos dice que podemos calcular el calor liberado en un bioproceso simplemente conociendo el coeficiente 'b' que acompaña al  $O_2$  en la reacción de crecimiento microbiano.

**Esta es una buena aproximación para calcular el calor liberado en un proceso aeróbico cuando desconozco los calores de combustión de los compuestos. Sin embargo, debe recordarse que es un valor aproximado y que no es aplicable a procesos anaeróbicos.**

Los calores de combustión de algunos compuestos empleados en bioprocesos se presentan en la siguiente tabla:

Compuesto	Cmol	$\Delta H_R$ [kJ/Cmol]
Glucosa	CH <sub>2</sub> O	467,5
Sacarosa	CH <sub>1,833</sub> O <sub>0,916</sub>	470,3
Ác.láctico	CH <sub>2</sub> O	454,27
Ác. acético	CH <sub>2</sub> O	437
Etanol	CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub>	683,4
Biomasa	CH <sub>1,8</sub> O <sub>0,5</sub> N <sub>0,2</sub>	552
Amoníaco	NH <sub>3</sub>	383

Tabla 1.3: Calores de combustión con CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y N<sub>2</sub> como referencia

## 1.7 Consistencia de datos experimentales

En las Secciones anteriores hemos descrito el comportamiento microbiano a través de ecuaciones homogéneas. Como hemos adelantado ya en la Sección 1.4, los rendimientos pueden ser calculados a partir de datos experimentales y mediante éstos, calcular otros rendimientos haciendo uso de alguno de los balances que hemos visto anteriormente. Muchas veces se calculan todos los rendimientos experimentalmente y se desea comprobar si estos son consistentes, o bien, se ha incurrido en errores experimentales. Para analizar esta consistencia normalmente se emplean los balances de carbono y grado de reducción (Ver subsecciones 1.6.1 y 1.6.3). Dado que siempre hay un error asociado a las medidas experimentales, se considera que hay consistencia de datos experimentales, en los siguientes casos [0]:

$$0,94 \leq y_{x/s} + y_{p/s} + y_{co2/s} \leq 1,06$$

$$0,93 \leq y_{x/s} \frac{\gamma_X^{NH_3}}{\gamma_S^{NH_3}} + y_{p/s} \frac{\gamma_P^{NH_3}}{\gamma_S^{NH_3}} + \frac{4b}{\gamma_S^{NH_3}} \leq 1,07$$

## 1.8 Conclusiones finales

A lo largo de este capítulo hemos aprendido a expresar el crecimiento microbiano y la producción de un producto de interés biotecnológico por medio de una reacción química, análoga a las que el alumno ha visto a lo largo de la carrera. A partir de los conocimientos adquiridos, estamos en condiciones de:

- Estimar la cantidad de biomasa o producto a obtener a partir de un determinado medio de cultivo.
- Diseñar cuantitativamente el medio de cultivo para la producción de una cantidad de biomasa o producto.
- Determinar el calor liberado durante el proceso biotecnológico.
- Estimar la cantidad de O<sub>2</sub> consumido y CO<sub>2</sub> producido durante el proceso biotecnológico.
- Analizar la consistencia de los datos experimentales mediante los balances.

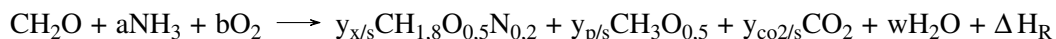


## 2. Cinética del crecimiento microbiano

En el capítulo anterior comenzamos a describir matemáticamente el crecimiento y la producción de producto en un bioproceso. Vimos que como en cualquier reacción química, un bioproceso puede expresarse de acuerdo al modelo de caja negra, en función de los reactivos (nutrientes) y productos (biomasa, productos metabólicos, etc). Hasta ahora, no hemos dicho nada sobre la velocidad a la que ocurre esta reacción. En el presente capítulo abordaremos conceptos de cinética microbiana para lograr contestar preguntas como: ¿A qué velocidad crece el microorganismo? ¿De qué depende esta velocidad?, ¿A qué velocidad se genera producto? ¿A qué velocidad debo extraer calor del biorreactor para mantener la temperatura del mismo constante?. Estas preguntas y muchas más podrán ser contestadas una vez que el alumno haya finalizado este capítulo.

### 2.1 Velocidades en bioprocesos

Para definir las velocidades a las cuales se lleva a cabo un bioproceso, utilizaremos el ejemplo planteado en la Sección 1.4:



En este ejemplo podemos observar como se relacionan los nutrientes del medio de cultivo con los productos a través de los rendimientos estequiométricos. Sin embargo, desconocemos hasta el momento a que velocidad se lleva a cabo el proceso. La velocidad a la cual transcurre un bioproceso puede ser descrita microscópicamente desde la óptica de un microorganismo como unidad básica (velocidad específica) o bien puede describirse macroscópicamente desde la óptica del proceso global donde la unidad básica sería el biorreactor (velocidad volumétrica). A continuación definiremos cada una de ellas.

#### 2.1.1 Velocidades específicas

Cada microorganismo como unidad básica, tiene una velocidad de consumo de sustratos y formación de producto representada por su correspondiente **velocidad específica** ( $q_i$ ). Estas

velocidades nos brinda información acerca del estado fisiológico de la célula. Tiene unidades de cantidad de compuesto (i) dividido la cantidad de biomasa (X) por unidad de tiempo.

$$q_i \left[ \frac{g_i}{g_x \times h} \text{ o } \frac{Cmol_i}{Cmol_x \times h} \text{ o } \frac{mol_i}{Cmol_x \times h} \right]$$

Así podemos tener por ejemplo una velocidad específica de consumo de FCE  $q_s$  en  $\frac{g_s}{g_x h}$ , una velocidad específica de consumo de oxígeno  $q_{O_2}$  en  $\frac{mol_{O_2}}{Cmol_x h}$  o una velocidad específica de producción de etanol igual a  $q_p$  en  $\frac{Cmol_p}{Cmol_x h}$ , etc. Como podemos ver, podemos expresar la velocidad específica en varias unidades, lo importante es tener en cuenta que siempre está referido a una cantidad de biomasa. En forma esquemática, las velocidades específicas para el ejemplo dado pueden representarse de la siguiente manera:



Figura 2.1: Representación del modelo de caja con las correspondientes velocidades específicas de consumo de sustrato y formación de producto

Si observamos la Fig. 2.1 podemos ver que la velocidad específica de crecimiento, o dicho de otro modo, la velocidad de producción de biomasa, no se representa como  $q_x$  sino que está simbolizada con la letra griega  $\mu$ . Ésta representa la velocidad a la cual cada individuo se replica para formar nuevos individuos. A diferencia del resto de las velocidades específicas,  $\mu$  tiene unidades de  $h^{-1}$ , dado que la unidad en el numerador (por ej.  $Cmol_x$ ) se cancela con la unidad del denominador. Debido a que la producción de biomasa es uno de los principales objetivos de un bioproceso,  $\mu$  es una velocidad de gran importancia y va a depender de las condiciones y del medio de cultivo. Estos se describirán en detalle en la próximas secciones.

### 2.1.2 Velocidades volumétricas

Para abordar el concepto de velocidad volumétrica consideraremos el cultivo de una levadura en erlenmeyer (Fig. 2.2). Dado que no hay ingreso o egreso de líquido durante el proceso, el mismo es un típico ejemplo de cultivo batch.

A la izquierda de la Fig. 2.2 se representa el erlenmeyer inmediatamente después de la inoculación ( $t = 0$  h). En este instante de tiempo el microorganismo comienza a asimilar sustratos y producir productos a unas determinadas  $q_i$ . Transcurridas las 2h de cultivo, la biomasa se ha replicado, pero dado que las condiciones de cultivo se han mantenido constantes y los sustratos están en exceso, las velocidades  $q_i$  son las mismas que al inicio del cultivo. Dicho de otra manera, la



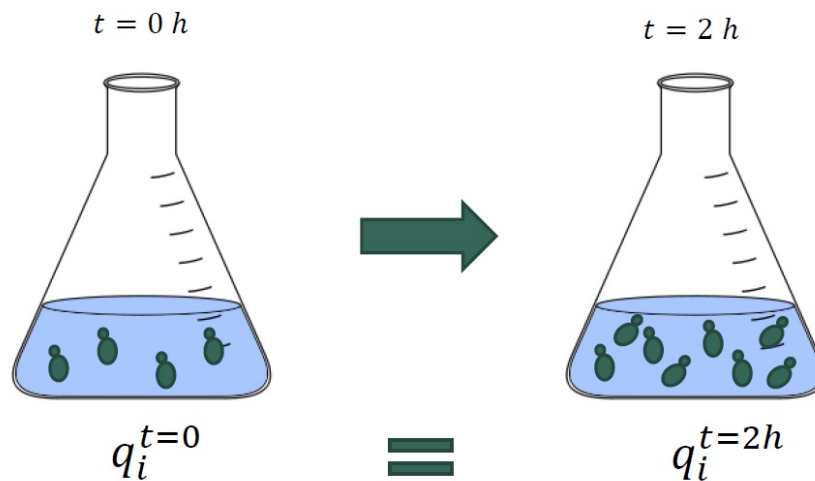


Figura 2.2: Cinética de un cultivo batch en erlenmeyer.

velocidad a la cual cada individuo consume sustrato y produce productos es la misma a  $t = 0$  h y a  $t = 2$  h. Sin embargo, el consumo global del sistema no va a ser el mismo a medida que evoluciona el cultivo, ya que cada vez hay más microorganismos. Es por ello, que se requiere definir una velocidad que tenga en cuenta la evolución de las variables macroscópicas cuando se incrementa la biomasa. Esta velocidad se obtiene de multiplicar las velocidades específicas por la concentración de biomasa que hay en ese momento en el biorreactor.

$$r_i = q_i \times X$$

Y tiene unidades de

$$r_i \left[ \frac{g_i}{l \times h} \text{ o } \frac{Cmol_i}{l \times h} \text{ o } \frac{mol_i}{l \times h} \right]$$

La velocidad que acabamos de definir se denomina **velocidad volumétrica** y nos brinda información acerca de la evolución de las concentraciones de las especies (sustratos, productos) en el tiempo de cultivo. En forma esquemática, las velocidades específicas para el ejemplo dado pueden representarse de la siguiente manera:

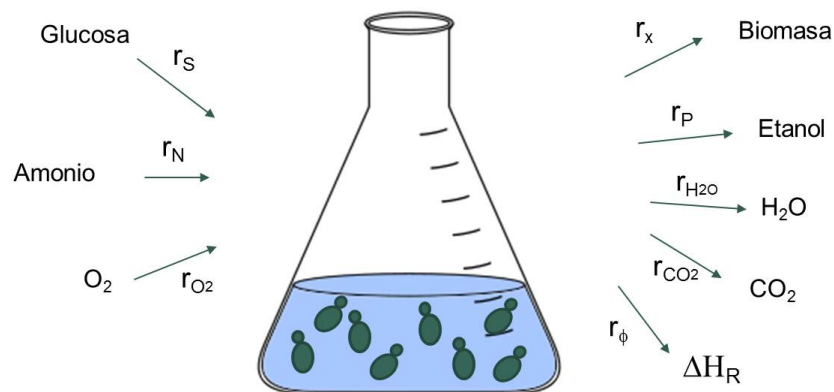
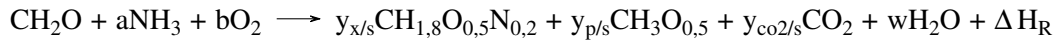


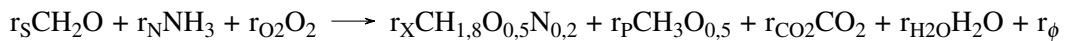
Figura 2.3: Representación de las velocidades volumétricas en un biorreactor tipo erlenmeyer.

## 2.2 Relación entre velocidades y rendimientos

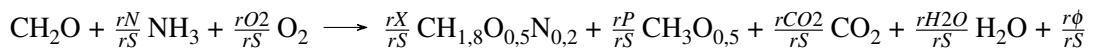
En el capítulo 1 de este apunte hemos planteado la reacción que describe un bioproceso con las especies extracelulares que intervienen en el mismo y con sus correspondientes coeficientes estequiométricos, los cuales representan los rendimientos respecto de la FCE. Luego, en la sección 2.1 utilizamos el siguiente ejemplo:



Así como planteamos estequiométricamente la reacción de crecimiento microbiano, podemos hacerlo considerando la cinética a la cual ocurre este proceso:



Para poder comparar con la ecuación que conocemos, expresamos todos los componentes de la reacción en función de la FCE, esto es, dividimos todo por  $r_S$ :



Si comparamos ambas reacciones podemos notar rápidamente que es posible expresar los rendimientos estequiométricos como cociente de velocidades volumétricas, esto es:

$$a = \frac{r_N}{r_S}$$

$$b = \frac{r_{\text{O}_2}}{r_S}$$

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S}$$

$$y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S}$$

$$y_{\text{CO}_2/S} = \frac{r_{\text{CO}_2}}{r_S}$$

$$w = \frac{r_{\text{H}_2\text{O}}}{r_S}$$

$$\Delta H_R = \frac{r_\phi}{r_S}$$

En forma genérica podríamos decir que:

$$y_{i/S} = \frac{r_i}{r_S}$$

A su vez, si recordamos la relación entre las velocidades volumétricas y específicas (Ver subsección 2.1.2):

$$y_{i/S} = \frac{r_i}{r_S} = \frac{q_i \times X}{q_S \times X} = \frac{q_i}{q_S}$$

Como podemos ver en la ecuación anterior, cualquier rendimiento pueden expresarse en forma análoga como el cociente de las velocidades específicas correspondientes. Luego,

$$a = \frac{q_N}{q_S}$$

$$b = \frac{q_{O_2}}{q_S}$$

$$y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S}$$

$$y_{P/S} = \frac{q_P}{q_S}$$

$$y_{CO_2/S} = \frac{q_{CO_2}}{q_S}$$

$$w = \frac{q_{H_2O}}{q_S}$$

$$\Delta H_R = \frac{q_\phi}{q_S}$$

**Ejercicio 2.2.1 — Cálculo de velocidades.** Determinar la velocidad volumétrica de consumo de glucosa en  $g_S/lh$  de un microorganismo creciendo a un  $\mu_{max}$  de  $0,3 h^{-1}$  cuando la biomasa alcanza un valor de  $2,5 g/l$ . De estudios previos se sabe que el  $y_{X/S}$  es de  $0,5 Cmol_X/Cmol_S$ .

Solución: Hemos visto previamente que cualquier rendimiento puede calcularse como el cociente de velocidades específicas o volumétricas. En este ejercicio se pide calcular la velocidad volumétrica de consumo de glucosa, esto es,  $r_S$ . Para ello, el problema nos brinda como dato el rendimiento de biomasa en sustrato ( $y_{X/S}$ ). Luego, expresamos el rendimiento anterior como cociente de las velocidades volumétricas correspondientes:

$$y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S}$$

$$r_S = \frac{r_X}{y_{X/S}}$$

Para calcular  $r_S$  tenemos el dato del rendimiento en  $Cmol_X/Cmol_S$ , el cual debemos convertir a unidades de  $g_X/g_S$ , ya que se pide  $r_S$  en unidades de  $g_S/lh$ . Para ello, consideramos biomasa estándar y realizamos la siguiente conversión de unidades:

$$y_{X/S} = 0,5 \frac{Cmol_X}{Cmol_S} \times \frac{1Cmol_S}{30g_S} \times \frac{25,9g_X}{1Cmol_X} = 0,43 \frac{g_X}{g_S}$$

El valor de la de velocidad volumétrica de crecimiento ( $r_X$ ) no es un dato del problema, sin embargo, podemos calcularlo a partir de la velocidad específica de crecimiento  $\mu_{max}$  y la concentración de biomasa ( $X$ ) en ese instante.

$$r_X = \mu X = 0,3h^{-1} \times 2,5g_X/l = 0,75g_X/lh$$

Por lo tanto,

$$r_S = \frac{r_X}{y_{X/S}} = \frac{0,75g_X/lh}{0,43g_X/g_S} = 1,74 \frac{g_S}{lh}$$

### 2.3 Velocidad específica de crecimiento

Dada la importancia que tiene la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en un proceso biotecnológico, vamos a dedicar esta sección a su estudio. No debemos perder de vista que la producción biotecnológica de productos siempre requiere biomasa, con lo cual es importante saber a que velocidad puede reproducirse cada microorganismo y como se ve afectada esta velocidad por los parámetros y variables de cultivo. A continuación veremos brevemente los principales factores, comenzando por la relación entre  $\mu$  y la concentración de sustrato en el medio de cultivo.

Jacques Monod describió el año 1940 una ecuación que relaciona  $\mu$  con la concentración de sustrato limitante (S), la cual conocemos en la actualidad como ecuación de Monod. Esta ecuación trata de describir las observaciones de varios experimentos que él realizó donde percibió que a bajas concentraciones de sustrato  $\mu$  variaba, mientras que a mayores concentraciones  $\mu$  era independiente de la concentración de sustrato. Esto lo expresó matemáticamente, por medio de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S + [S]}$$

Esta ecuación, muy similar a la ecuación de Michaelis-Menten que vimos en la clase de enzimas, tiene dos constantes  $\mu_{max}$  y  $K_S$ . Por un lado,  $K_S$  se denomina constante de saturación media y es la concentración de sustrato limitante para la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad de  $\mu_{max}$ . Por su parte,  $K_S$  es un parámetro que nos brinda información acerca de la afinidad de un microorganismo por un sustrato en particular, bajo determinadas condiciones de cultivo. El microorganismo será mas afín a un sustrato cuanto menor sea el  $K_S$  de ese sustrato en las condiciones de crecimiento. La Tabla 2.1 nos brinda información acerca de los valores de  $K_S$  de algunos sustratos para *Escherichia coli* creciendo a 37°C.

Sustrato limitante	$K_S$ (mg/l)
Glucosa	4
Lactosa	20
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1,6
Arginina	0,5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,1-1

Tabla 2.1: Constante de saturación media de sustratos para *E. coli* creciendo a 37°C

La ecuación de Monod puede representarse de la siguiente manera (Fig. 2.4):

En ésta, podemos detectar 3 zonas:

- Cuando  $S \llll K_S$ ,  $\mu$  va a depender linealmente de la concentración de sustrato.

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S}$$

- Cuando S es del orden de  $k_S$ ,  $\mu$  va a depender de S siguiendo la ecuación de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{max}[S]}{K_S + [S]}$$



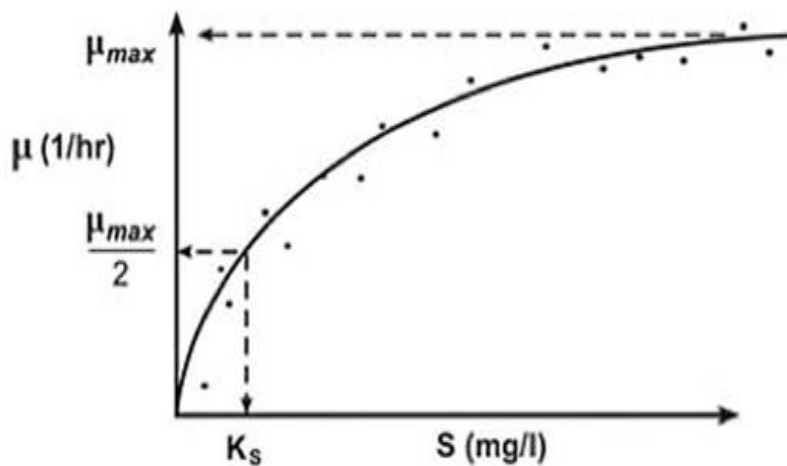


Figura 2.4: Representación gráfica de la ecuación de Monod.

- Cuando  $S \gg \gg K_S$ ,  $\mu$  no depende de la concentración de sustrato y toma su valor máximo en esas condiciones ( $\mu_{max}$ ).

$$\mu = \mu_{max}$$

En cuanto a  $\mu_{max}$ , como se dijo anteriormente, es la máxima velocidad a la que puede crecer un microorganismo en determinadas condiciones de cultivo. Por lo tanto, es importante conocer como varía  $\mu_{max}$  respecto de las condiciones de cultivo. En este apunte abordaremos los parámetros más importante que pueden afectar el valor de  $\mu_{max}$ . No debemos olvidar que al hablar de  $\mu_{max}$  asumimos que todos los nutrientes del medio de cultivo (incluyendo el sustrato limitante) están en exceso, con lo cual la concentración de S no puede ser nunca un factor que afecte a  $\mu_{max}$ .

### 2.3.1 Influencia del tipo de microorganismo en $\mu_{max}$

La velocidad específica de crecimiento está influenciada por factores ambientales y factores endógenos. Entre los factores endógenos está la organización morfológica, la regulación y el control intracelular. Por ello, no es ilógico pensar que la velocidad máxima a la cual puede reproducirse un microorganismo dependerá esencialmente de la complejidad del sistema celular y por ende, del tipo de microorganismo que se trate. Luego, microorganismos de menor complejidad morfológica como las bacterias (procariontas) pueden replicarse a mayor velocidad de lo que podría hacerlo una célula eucariota, la cual está compartimentalizada en diferentes organelas por sistemas de endomembranas. Dado que estos conceptos ya se han abordado previamente en la materia bastará con decir que a menor complejidad, mayor será el  $\mu_{max}$  y decrecerá a medida que aumente la complejidad del sistema.  $\mu_{max}$  como vemos está relacionada con el tiempo que tarda un microorganismo en duplicarse. A este tiempo se lo denomina tiempo de duplicación ( $t_D$ ) y se relaciona con  $\mu$  de la siguiente manera:

$$t_D = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

En la Tabla 2.2 se presentan algunos valores de  $\mu$  y  $t_D$  de diferentes microorganismos y se los compara con células vegetales y animales.

Debe tenerse en cuenta que los valores de la Tabla 2.2 son orientativos y que existen microorganismos que están fuera de los rangos típicos para su clase.

Microorganismos/células	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$t_D$ (h)
Bacterias	0,6-1,4	0,5-1,15
Levaduras y hongos filamentosos	0,2-0,6	1,15-3
Célula animales	0,01-0,04	17-70
Célula vegetales	0,007-0,03	23-100

Tabla 2.2:  $\mu_{max}$  y  $t_D$  para diferentes tipos de microorganismos y células

### 2.3.2 Influencia de la temperatura en $\mu_{max}$

El efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento es complejo ya que depende exclusivamente del metabolismo microbiano y, por ende, varía de microorganismo a microorganismo. Ya hemos visto a lo largo de la asignatura que un microorganismo es un reactor complejo compuesto por varias reacciones interconectadas que constituyen el metabolismo microbiano. Estas reacciones metabólicas están en su mayoría catalizadas por enzimas. Estos biocatalizadores, como hemos visto previamente, dependen de la temperatura dada su naturaleza proteica y, por ende, la velocidad a la que crece un microorganismo también se verá influenciado por la misma. El efecto global de la temperatura sobre el crecimiento microbiano se representa en la Fig. 2.5. A medida que se incrementa la temperatura,  $\mu_{max}$  se incrementa ya que la velocidad global de las reacciones que componen el metabolismo aumenta. Además, con el incremento de la temperatura aumenta la fluidez de la membrana plasmática y con ella la difusión y transporte de nutrientes. Sin embargo, a partir de una determinada temperatura, las enzimas que catalizan las reacciones claves del metabolismo se inactivan con lo cual  $\mu_{max}$  decae abruptamente. Junto con las enzimas, otras proteínas como los transportadores de membrana también pueden verse alteradas por la temperatura y con ello se afecta la asimilación de nutrientes. A temperaturas muy elevadas, la muerte celular ocurre por disrupción de la membrana plasmática. Como puede verse en la Fig. 2.5, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en la intersección de ambos efectos y por encima de la misma la velocidad de crecimiento cae abruptamente.

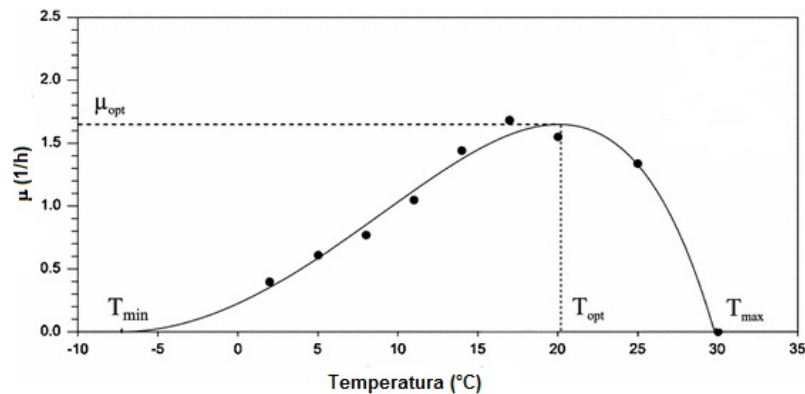


Figura 2.5: Efecto de la temperatura en la velocidad específica de crecimiento microbiano

La temperatura óptima de crecimiento de un microorganismo depende mucho del entorno y del tipo de microorganismo. Normalmente se emplean clasificaciones para agrupar a los microorganismos que crecen en un determinado rango de temperatura. Estos microorganismos tienen características metabólicas que les permiten tener un comportamiento similar frente a este factor. En la tabla 2.3 se presenta una clasificación de microorganismos de acuerdo a la temperatura.

Desde el punto de vista productivo, conviene conocer la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo que se cultiva con propósito biotecnológico. Normalmente, se busca cultivar a los microorganismos a una temperatura cercana a la óptima.

Clasificación	Rango de temperatura (°C)	Temperatura óptima (°C)
Psicrófilos	0-20	~ 15
Psicrótrofos	10-30	~ 20
Mesófilos	15-45	~ 35
Termófilos	35-70	~ 60

Tabla 2.3: Clasificación de microorganismos de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento

### 2.3.3 Influencia del pH en $\mu_{max}$

El pH del medio donde crecen los microorganismos tiene gran influencia en la  $\mu$ . Como en el caso de la temperatura, el pH influye en la estabilidad de las proteínas que constituyen al microorganismo, y por ende habrá un pH al cual la velocidad de crecimiento es óptima y pH a los cuales el microorganismo no puede crecer y reproducirse. En general, los microorganismos pueden crecer en una variada gama de pH que van desde pH = 2 hasta pH = 11. Son excepcionales los microorganismos que pueden crecer por debajo o encima de este rango. Además, los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa. En forma general, siempre hay un rango de pH óptimo para el crecimiento en el cual  $\mu_{max}$  es óptima (Fig. 2.6) y es el que representa menor gasto energético para mantener el pH intracelular. Dicho pH se mantiene gracias a los sistemas buffer internos y a bombas de protones que intercambian protones con el medio a expensas de ATP. Si el gasto energético para mantener el pH es muy elevado, el crecimiento disminuye o incluso el microorganismo puede morir.

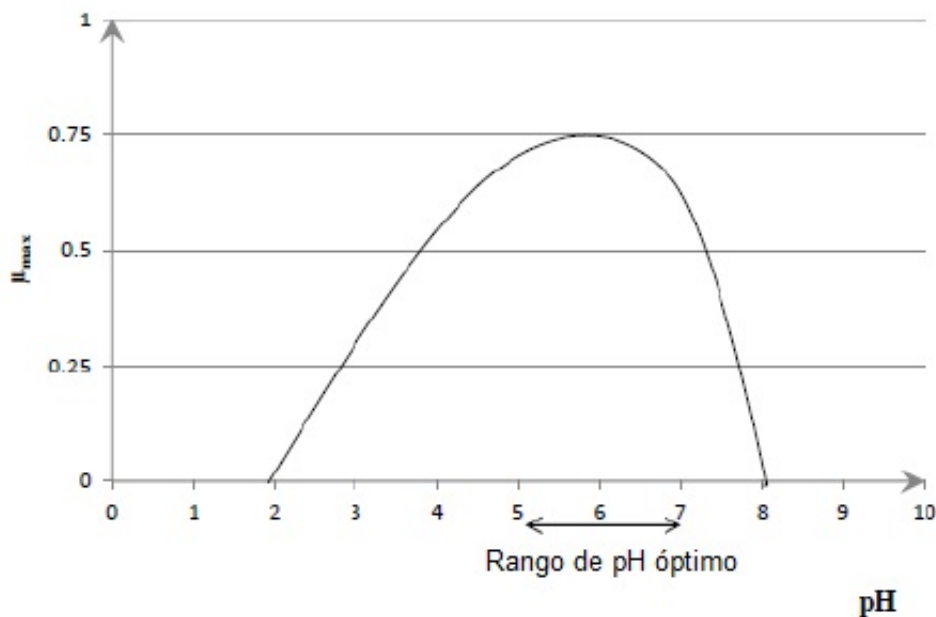


Figura 2.6: Efecto del pH en la velocidad específica de crecimiento microbiano

Como en el caso de la temperatura, existe una clasificación de microorganismos de acuerdo al rango de pH en el cual  $\mu_{max}$  es óptima (Tabla 2.4). En general, la mayoría de las bacterias son neutrófilas, aunque hay géneros acidófilos como las bacterias de ácido láctico. Los hongos filamentosos y levaduras toleran más los pH ácidos que las bacterias, con pH óptimos entre 4 y 5,5. Las arqueas, por su parte, son microorganismos procariontes habituados a crecer en condiciones extremas, con lo cual tienen ejemplares acidófilos y alcalófilos, los cuales tienen enzimas estables a estos pH extremos.

Clasificación	Rango de pH óptimo
Acidófilos	2-5,5
Neutrófilos	5,5-8
Alcalófilos	8-11

Tabla 2.4: Clasificación de microorganismos de acuerdo al rango de pH óptimo de crecimiento

### 2.3.4 Influencia de la composición del medio de cultivo en $\mu_{max}$

La calidad del medio de cultivo del cual los microorganismos extraen los nutrientes para crecer tiene influencia en la velocidad específica a la que crecen. Ya hemos visto en la Sección 1.1, que los microorganismos toman los nutrientes disponibles en el medio de cultivo para obtener energía y poder reductor a partir de las reacciones de catabolismo y emplear dichos productos en la generación de un nuevo individuo mediante la síntesis de sus macromoléculas constitutivas por medio de las reacciones de anabolismo. Cuanto más sencillo sea el camino de aprovechamiento de nutrientes, mayor será la energía disponible para las reacciones de anabolismo o, dicho de otro modo, más rápido podrá reproducirse. Los medios de cultivo de composición compleja contienen gran parte de los monómeros que se requieren para las reacciones anabólicas, con lo cual, el microorganismo gasta menor cantidad de recursos para producirse a sí mismo. Entenderemos mejor estos conceptos con el siguiente ejemplo. Para generar las proteínas que requiere el microorganismo ya sea enzimas o proteínas estructurales, se requiere de los aminoácidos que son las unidades monoméricas que definirán en última instancia su naturaleza y funcionalidad. Si el medio de cultivo contiene una sal inorgánica de amonio, el  $\text{NH}_4^+$  ingresa en la célula y reacciona con el  $\alpha$ -cetoglutarato dando lugar a los aminoácidos glutamina y glutamato. Estos aminoácidos darán lugar al resto de los aminoácidos necesarios mediante diversas rutas metabólicas. La producción de estos aminoácidos requiere energía y poder reductor, con lo cual si en el medio de cultivo se agregan nutrientes que contengan los aminoácidos preformados (ej. hidrolizados de proteínas o peptonas), la célula se ahorrará recursos para producir estos aminoácidos y el microorganismo podrá crecer a una mayor velocidad. En la siguiente tabla se ejemplifica lo anterior con datos de cultivo batch de la levadura *Rhodospiridium toruloides* creciendo en diferentes fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	$\mu_{max}$
Peptona ácida de caseína	0,134
Glutamato	0,129
Urea	0,110
Nitrato de sodio	0,109
Glicina	0,105
Sulfato de amonio	0,103

Tabla 2.5: Velocidad específica de crecimiento de *R. toruloides* en cultivo batch con diferentes fuentes de nitrógeno.

## 2.4 Conclusiones finales

A lo largo de este capítulo hemos aprendido cómo expresar la velocidad a la cual el microorganismo crece y genera productos biotecnológicos. A partir de los conocimientos adquiridos estamos en condiciones de:

- Estimar las velocidades a las que el microorganismo en forma individual consume sustratos y produce productos (velocidades específicas).
- Estimar las velocidades a las que el sistema consume sustratos y produce productos.

- Determinar la velocidad de remoción de calor en un bioproceso (velocidades volumétricas).
- Estimar la velocidad de suministro de O<sub>2</sub> (en microorganismos aeróbicos).
- Estimar rendimientos respecto a sustratos y productos.







### 3. Bibliografía de referencia

Castañeda, M. T. (2016). *Obtención, caracterización y aplicación de un biocatalizador para la reducción del contenido de fenilalanina en hidrolizados proteicos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Mignone, C., Yantorno, O. y Ertola, R. (1994). *Microbiología industrial*. Buenos Aires, Argentina: Organización de Estados Americanos - OEA

Shulter, M. L., & Kargi, F. (2000). *Bioprocess engineering basic concept*. New Delhi: Parentice-Hall of India Pvt Ltd.