

Biotecnología tema 5: Crecimiento de microorganismos en medio no renovado o discontinuo. Características.

A- Modelo de MONOD. Velocidad específica de crecimiento corregida para varios sustratos.

Variables de proceso a considerar.

B- Cultivo continuo de microorganismos. Definiciones. Empleo del modelo de MONOD:

cinética y cálculo del estado del equilibrio. Turbidostato y Quimiostato. Aplicación del modelo de MONOD a la optimización de un Quimiostato. Comparación continuo versus discontinuo. Continuo en dos etapas mono y multicorriente. Número de etapas en un sistema monocorriente. Variables de proceso a considerar.

C- Cultivo por lote alimentado: características. Variables de proceso a considerar.

D- Clasificación de los procesos de fermentación: Tipos I, II y III. Productividad y velocidad específica de producción. Coeficientes de rendimiento. Producción de calor.

Tema 5: Cinética del crecimiento microbiano

En un ambiente adecuado, una célula microbiana unicelular aumenta de tamaño y luego por escisión binaria o gemación se divide en 2 células. La célula “madre” se dice “viable”. Se dice que una célula microbiana es “NO VIABLE” cuando en ese medio es incapaz de reproducirse.

Esto puede ocurrir por varias razones:

- La célula está simplemente muerta;
- El medio ambiente no le es propicio por falta de algún nutriente esencial, presencia de sustancias tóxicas;
- El medio físico no es el adecuado por presencia o ausencia de oxígeno, o valores inapropiados de pH y temperatura.

En el caso de microorganismos que esporulen (bacterias, hongos, levaduras) pueden sobrevivir como esporas durante largos períodos de tiempo y si son organismos superiores como los enteros parásitos, la supervivencia hemos visto puede llegar a períodos del orden de un año como huevos o quistes.

A diferencia de organismos pluricelulares, los organismos unicelulares presentan un alto grado de adaptabilidad para responder tanto a cambios físicos como químicos. Por ejemplo: si un organismo bacteriano anaerobio facultativo se encuentra en un medio desprovisto de oxígeno,

inducirá la producción de las enzimas necesarias para llevar a cabo su metabolismo oxidativo cuando se le suministra energía.

El CRECIMIENTO puede considerarse como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. En el caso de un organismo unicelular esto conduce a un aumento del número de individuos.

El crecimiento de las poblaciones microbianas puede ser:

- **En sistema cerrado**: cultivo intermitente, discontinuo, no renovado o BATCH
- **En sistema abierto** o cultivo continuo con una variante: el cultivo alimentado por lotes o recargas.

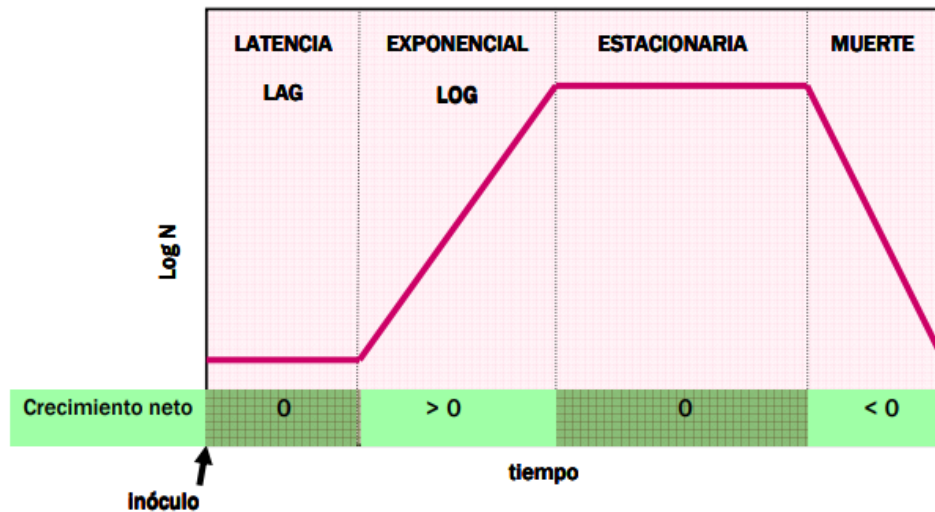
Medición del crecimiento microbiano

- Concentración celular: número de células por unidad de volumen (Generalmente [10^6 cél/ml]). Se emplean una cámara de recuento y un microscopio. Es relativamente rápido y exacto. Existen coloraciones que permiten distinguir células vivas de células muertas. (Agotador!!)
- Recuento en caja de Petri: Requiere no menos de 24hs. Permite conocer si hay más de una especie presente en el medio de cultivo.
- Peso húmedo: Normalizadas las condiciones se centrifuga un determinado volumen. Errores considerables.
- Medida de la absorbancia: (generalmente a 600nm) como las células desvían la luz, la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro es inversamente proporcional al número de células (Ley de Beer)
- Densidad celular: masa celular o biomasa seca por unidad de volumen: filtración a través de MF (0.2 ó 0,45 μ m para bacterias o 1,2 μ m para levaduras) [g/l]
- Sólidos suspendidos volátiles

Los SSV proporcionan un método de estimar la biomasa cuando se estudia el tratamiento biológico de efluentes líquidos.

Crecimiento discontinuo

En este caso no se añade medio de cultivo nuevo o fresco (No renovado). Si un medio adecuado se inocula con células (inóculo) tiene lugar lo que se llama CURVA DE CRECIMIENTO y puede describirse por medio de una gráfica [n° de células/ ml] vs tiempo.



- Fase de latencia: no aumenta el n° de células; su duración depende de los antecedentes del inóculo; síntesis de enzimas.
- Fase exponencial o logarítmica: la población aumenta a velocidad máxima duplicándose a intervalos regulares por lo que la concentración de sustrato disminuye en razón inversa mientras se pueden ir o no acumulando los productos finales del metabolismo.
- Fase estacionaria: no hay crecimiento neto; si las células continúan multiplicándose, la velocidad de crecimiento es igual a la rapidez de muerte celular; se produce por agotamiento de un nutriente esencial, por formación por productos tóxicos o cambios físicos (variaciones de pH o temperatura); las células pueden permanecer viables mediante un "metabolismo endógeno" o por oxidación y almacenamiento de la degradación de polímeros, proteínas, etc.
- Fase de declinación: la velocidad de muerte supera netamente al crecimiento, se produce la "autólisis" de las células.

El cultivo en medio renovado es el que normalmente se presenta en la naturaleza (ej: un charco, una gota de agua), en la elaboración de productos alimenticios (yogurt, vino, cerveza, etc) y en la industria farmacéutica (producción de antibióticos, ácidos orgánicos, etc).

Fase de crecimiento exponencial

El crecimiento microbiano unicelular es autocatalítico.

La fase exponencial es la más importante.

Tiempo de generación: es el tiempo transcurrido para que una célula dé origen a otra (escisión binaria o gemación).

Este tiempo varía considerablemente entre distintas células de un cultivo pero la media aritmética permanece prácticamente constante durante toda la fase y es lo que llamamos "tiempo de generación".

$$N_0 \xrightarrow{\quad \theta \quad} 2n_0 \quad (1\theta, 1 \text{ generación})$$

$$2n_0 \xrightarrow{\quad \theta \quad} 4n_0 = 2^2 n_0 \quad (2 \theta, 2 \text{ generaciones})$$

$$2^2 n_0 \xrightarrow{\quad \theta \quad} 2^3 n_0; \quad (3\theta, 3 \text{ generaciones})$$

$$2^{z-1} \xrightarrow{\quad \theta \quad} 2^z n_0$$

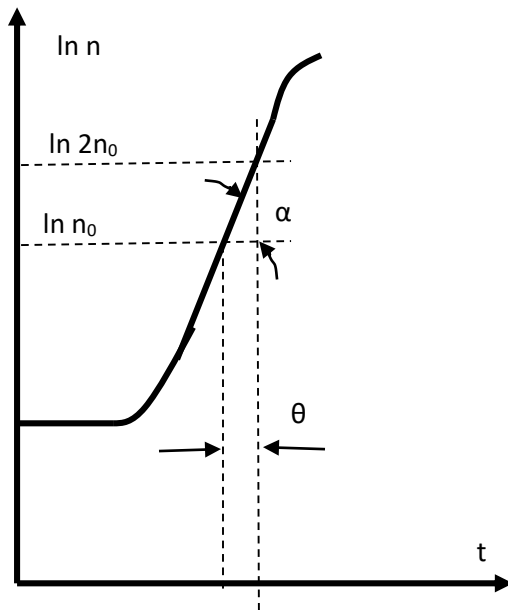
$$N = 2^z n_0$$

$$N = 2^z n_0$$

$$\ln n = z \ln 2 + \ln n_0$$

$$\frac{\ln n - \ln n_0}{\ln 2} = z = \frac{t}{\theta}$$

$$\theta = \frac{t \ln 2}{\ln n - \ln n_0}$$



Velocidad específica de crecimiento (en función de n)

$$K = \frac{1}{n} \frac{dn}{dt}$$

$$dn/n = k dt \quad ; \quad \ln n/n_0 = k t$$

$n = n_0 e^{kt}$	→	$\ln n = \ln n_0 + kt$
		$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\ln n - \ln n_0}{t}$

Si $n = 2n_0 \longrightarrow t = \theta$

$$\ln 2n_0/n_0 = k = \theta$$

$\theta = \ln 2/k$

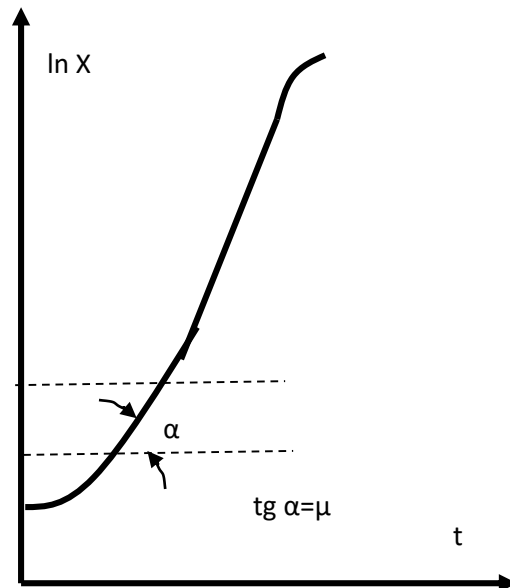
Velocidad específica de crecimiento (en función de x, densidad celular, [g/l])

$$\mu = \frac{1}{x} * \frac{dx}{dt}$$

$$\frac{dx}{x} = \mu * dt$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu * t$$

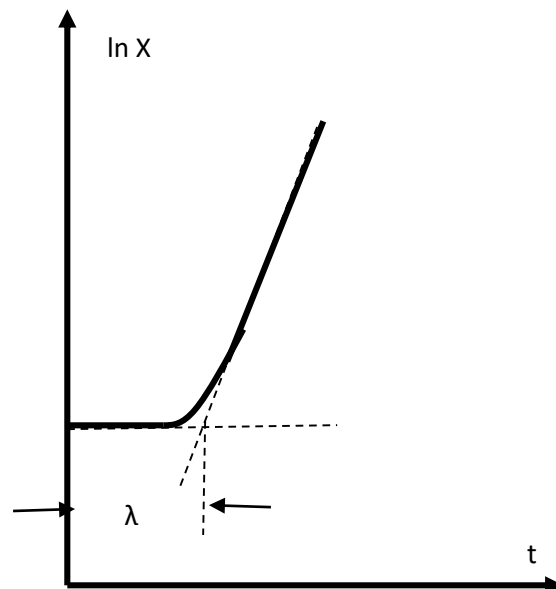
$$\ln x = \ln x_0 + \mu * t$$



$\mu = k$ sólo si los organismos son de la misma talla (esto sólo se cumple en el estado estacionario de un QUIMIOSTATO).

Fase de latencia

$$\frac{\ln n - \ln n_0}{t - \lambda} = \frac{\ln 2}{\theta}$$



- Razón de la fase de latencia
- Metodología práctica de disminución de la duración

Modelización de las otras fases

Para la fase de latencia $\mu=0$, para la fase logarítmica también tiene un valor constante que es el de μ_m y en la estacionaria vuelve a hacerse nula.

Se han propuesto, entre otros modelos, para modelizar todas las fases:

- KONO Y ASAI

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m x \Phi$$

Donde Φ es el coeficiente aparente de actividad que varia entre 0 y 1

Modelo Logístico

$$\frac{dx}{dt} = b_1 \left(1 - \frac{x}{b_2}\right) x$$

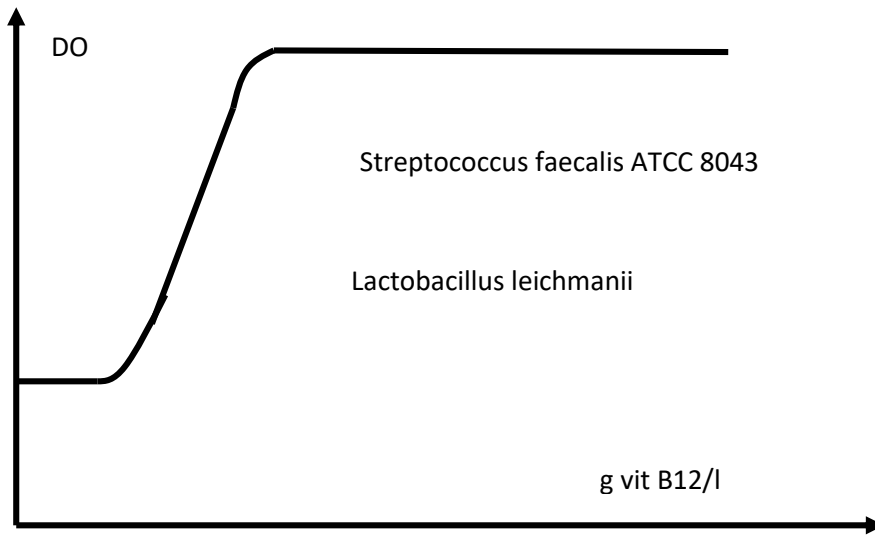
Donde b_1 y b_2 son constantes empíricas de cada sistema y además b_2 es la cantidad máxima posible de células.

$$x \rightarrow b_2 \rightarrow \frac{x}{b_2} = b_1 x \therefore \frac{dx}{dt} = 0 \text{ (fase estacionaria)}$$

$$\frac{x}{b_2} \rightarrow 0 \rightarrow \frac{dx}{dt} = b_1 x \text{ Modelo logaritmico}$$

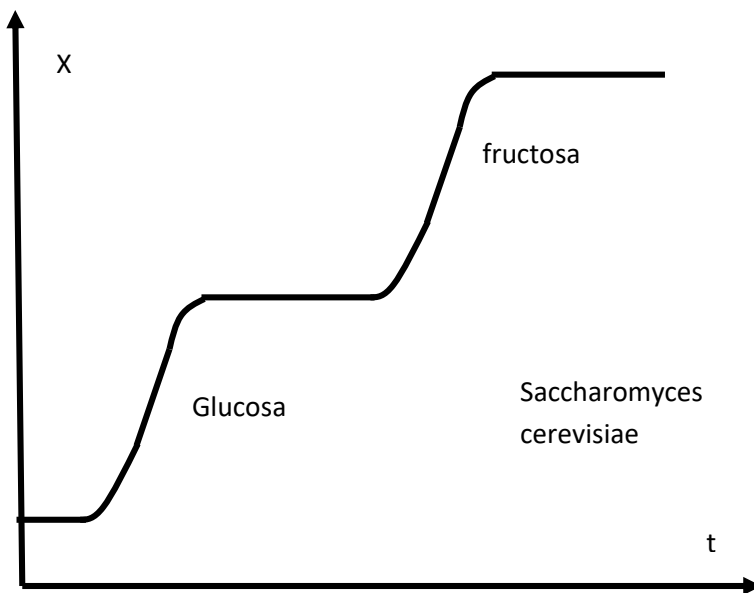
Máximo crecimiento

Organismo auxótrofo: necesita del medio de cultivo un compuesto intracelular que es incapaz de sintetizar (compuesto esencial)



Diauxia

La diauxia es un crecimiento con dos o más sustratos en donde se verifica el crecimiento normal con un sustrato (fase de latencia exponencial y estacionaria) hasta consumir este sustrato y comienza con esa concentración final de células un nuevo ciclo de crecimiento con un segundo sustrato con todas las fases nuevamente



Cualquiera sea la naturaleza del factor limitante se obtienen curvas análogas.

De una manera general, los factores limitantes no influyen sobre la velocidad específica de crecimiento hasta concentraciones muy bajas.

Ej: para el caso de Escherichia coli creciendo sobre glucosa el valor de la concentración de glucosa que asegura $\mu = \mu_m/2$ es de sólo 0,0029 g/l (En la serie de experiencias de MONOD).

Hay algunas excepciones: para Mycobacterium tuberculosis, ese valor es de 4 g/l!!

Una vez más, su genialidad hizo concluir a MONOD que estas curvas “velocidad específica de crecimiento versus concentración de sustrato limitante (1949) se corresponden, por analogía con la ecuación de MICHAELIS-MENTEN, a una ecuación hiperbólica:

$$\frac{-dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \text{Velocity} = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + S}$$

V= velocidad específica de crecimiento

V_m= máxima V

S= concentración de sustrato limitante

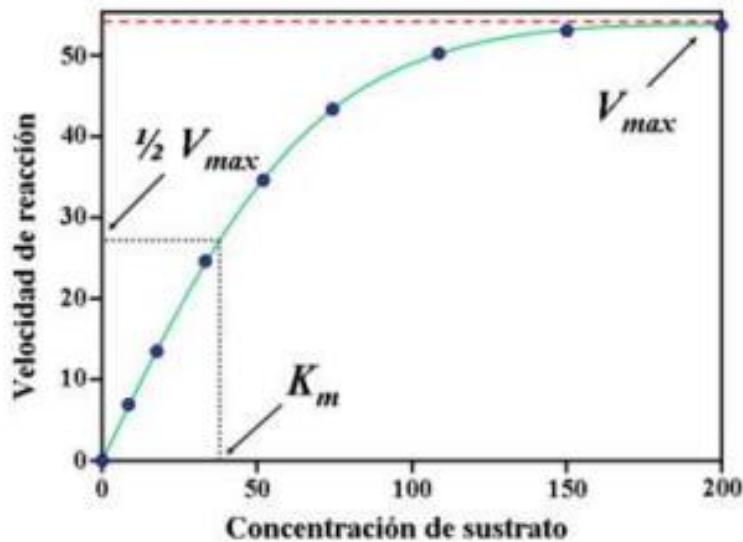
K_M= [S] para V=V_m/2

La **cinética de Michaelis-Menten** describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Recibe este nombre en honor a Leonor Michaelis y Maude Menten. Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima, y para condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es constante.

La ecuación de Michaelis-Menten es capaz de describir el cambio sufrido por la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al variar la concentración del sustrato. La reacción que se establece entre la enzima y su sustrato va precedida de la formación de un complejo, hipótesis que no pudo comprobarse experimentalmente hasta cincuenta años después del establecimiento de la ecuación gracias a la aplicación de las técnicas espectroscópicas.

Factores que afectan la VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

1. Concentración de sustrato



La figura representa la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración inicial de glucosa, de *E. coli*, en un medio de cultivo sintético donde la glucosa es el único factor limitante y todos sus otros constituyentes están en exceso.

Para S pequeños, μ es directamente proporcional a S .

Para valores altos de S , μ es independiente de la concentración S de glucosa alcanzando un valor límite μ_{\max} que solo depende de la actividad propia de los sistemas biosintéticos del microorganismo; μ_{\max} es un valor de la velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial.

MONOD llamó a la constante K_s CONSTANTE DE SATURACIÓN. Esto supone que K_s expresa afinidad de una enzima por su sustrato. Esta enzima, por ser la que presenta la velocidad de reacción más lenta, es la que controla la velocidad específica de crecimiento, resultado global de la catálisis de más de 2000 enzimas (caso *E. Coli*).

Con otras 2 ecuaciones, MONOD formuló lo que constituye el MODELO DE MONOD que supone que tanto la velocidad específica de crecimiento μ , como la velocidad específica de consumo de sustrato V_s se realizan según mecanismos cinéticos michaelianos:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad \text{velocidad específica de crecimiento} \\ V_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = V_{SM} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{velocidad específica de consumo de sustrato} \\ R_{x/s} = -\frac{dX}{dS} = \text{constante} = R \quad \text{rendimiento} \end{array} \right. \quad (218)$$

$$\mu = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_S + S}$$

$$V_S = \frac{1}{X} * \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S}{K_S + S}$$

$$R_{xs} = -\frac{dX}{dS}$$

R es el rendimiento másico [g biomasa/ g sustrato lim]

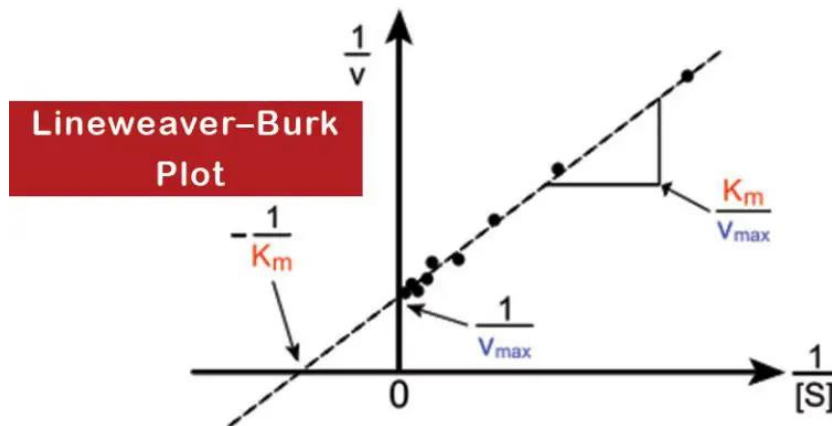
Y es una constante (si se verifican las otras 2)

A pesar de su simpleza (el modelo de Monod) hace abstracción de los aspectos bioquímicos celulares que son la causa del crecimiento), tal vez por eso, este modelo es de capital importancia.

Su formulación fue el primer intento de establecer una cinética para el crecimiento microbiano.

Correcciones que tienen en cuenta los aspectos bioquímicos, y más aún, hasta simplificaciones del Modelo han permitido el desarrollo de la Biotecnología aplicada tanto a la industria de las fermentaciones como a la Ingeniería Sanitaria.

La determinación de las constantes μ_m y K_s pueden hacerse a través de la aplicación de la linealización de LINEWEAVER – BURK:



$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Limitación doble de sustrato

Cuando hay 2 sustratos limitantes presentes, es decir, presentes en concentraciones tan bajas que la velocidad de crecimiento está limitada por ambos y que un aumento de concentración de cualquiera de ellos aumentará la μ .

$$\mu = \mu_{\max 1} \frac{s_1}{s_1 + K_{s1}} \mu_{\max 2} \frac{s_2}{s_2 + K_{s2}}$$

Esta ecuación puede sustituirse a "n" sustratos limitantes.

Inhibición por sustrato

Aunque las ecuaciones anteriores parecen indicar que aumentos de S llevan a aumentos de μ , en la práctica se observa que la velocidad de crecimiento comienza a declinar por encima de determinados valores de S. Esto puede expresarse como:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_m + S + K_1 S^2}$$

Este efecto se llama inhibición por sustrato y se produce para hidratos de carbono cuando $S > 10-20 K_s$.

Así la mayoría de los microorganismos crecen hasta 100 o 150 g/l de glucosa pero solo muy pocos crecen cuando la concentración supera los 300 – 500 g/l.

Esta es la razón por la que durante miles de años la conservación de alimentos se hizo en soluciones de alta concentración de azúcar (ej: los romanos enterrándolos en miel o las frutas en almíbar).

Es probable que elevadas concentraciones de azúcar o sal causen problemas osmóticos y disfuncionales y la muerte de las células por deshidratación. El uso de la sal como conservador sólo permite el crecimiento de organismos halófilos. En este caso la conservación se fundamenta en la selección sobre medios de cultivo ricos, como la carne, de bacterias lácticas (productoras de ácido láctico) para producir descensos relativamente grandes de pH (por debajo de 4).

Organismos anaerobios facultativos como E.Coli y Saccharomyces cerevisiae, en ausencia o presencia de oxígeno, oxidan a CO_2 y H_2O la glucosa generando energía para el crecimiento celular.

Cuando la concentración de azúcar aumenta, por ej: para E. Coli, por encima de los 2 g/l aún en presencia de oxígeno, las enzimas respiratorias se inhiben y el crecimiento es combinado respiratorio fermentativo y a baja velocidad, aunque el oxígeno llegue a valores de saturación.

Este efecto se llama REPRESIÓN CATABÓLICA y no es más que la represión de las enzimas responsables de las reacciones productoras de energía (catabolismo).

En la industria esto se evita alimentando el reactor con el sustrato carbonado a intervalos programados adecuadamente (recargas). Ej: producción de ácido cítrico o de levadura de panificación.

En el tratamiento biológico de efluentes que contengan productos tóxicos (ej: fenol, metanol, formaldehído) el empleo de cultivos seleccionados debe ir acompañado de una dilución previa del efluente y de recargas de efluente tal cual.

Puede ocurrir que el crecimiento celular vaya acompañado de la producción de metabolitos tóxicos que inhiban el crecimiento. Ej: etanol en la fermentación alcohólica. S.

cervisiae sólo tolera un 12% de etanol pero Zymomona mobilis puede superar holgadamente el 20%.

Como expresiones para modelizar la inhibición del crecimiento celular pueden emplearse:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{k_s + s} * (1 - kiI)$$

$$\mu = \mu_m \frac{S}{k_c + s} * \frac{ki}{ki + I}$$

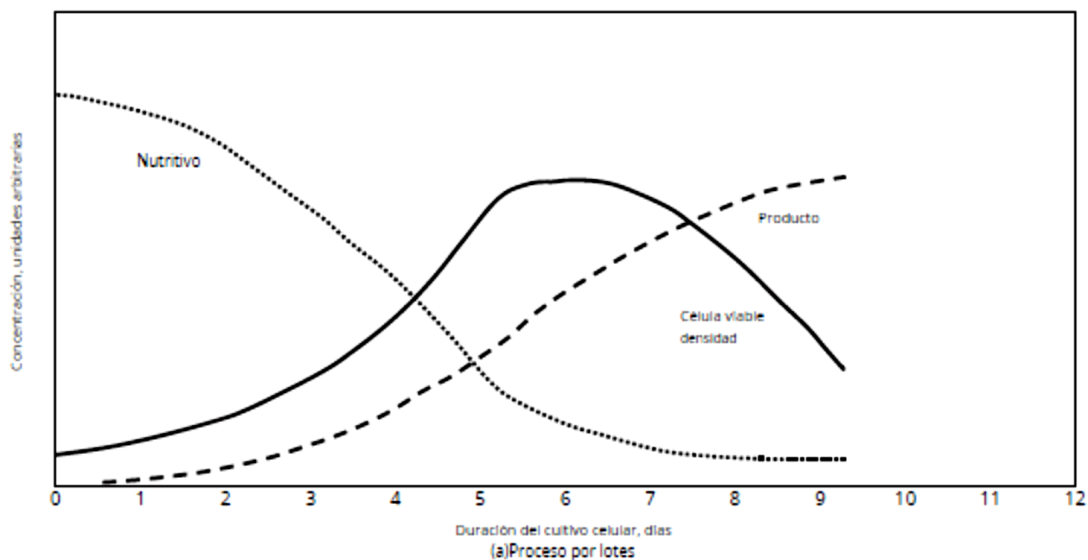
$$\mu = \mu_m \frac{S}{k_c + s} * e^{-kiI}$$

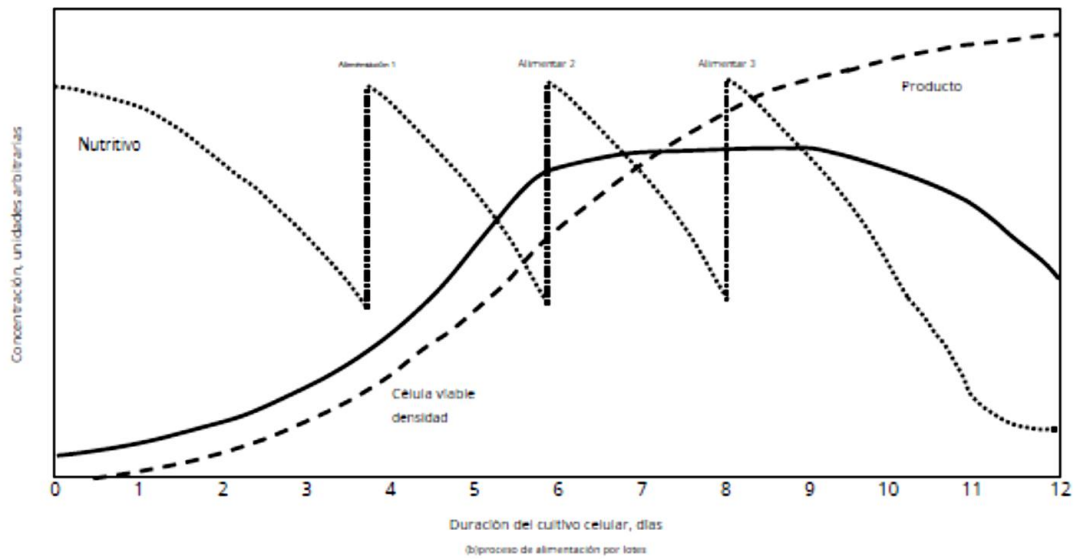
En las que I es la concentración del inhibidor y ki una constante.

Debe notarse que Ki no tiene el mismo significado para las 3 ecuaciones.

La elección de una u otra sólo es cuestión de conveniencia.

La forma de proceder cuando no se dispone de datos seguros es expandir la segunda o la tercera en forma de series y quedarse con la expresión que mejor se corresponda con los hechos experimentales observados.





Inhibición por producto

En este caso el producto es el inhibidor por ejemplo en la fermentación alcohólica el inhibidor es el etanol producido, a veces un gas como CO₂ que si no se retira del reactor puede inhibir el crecimiento de las levaduras.

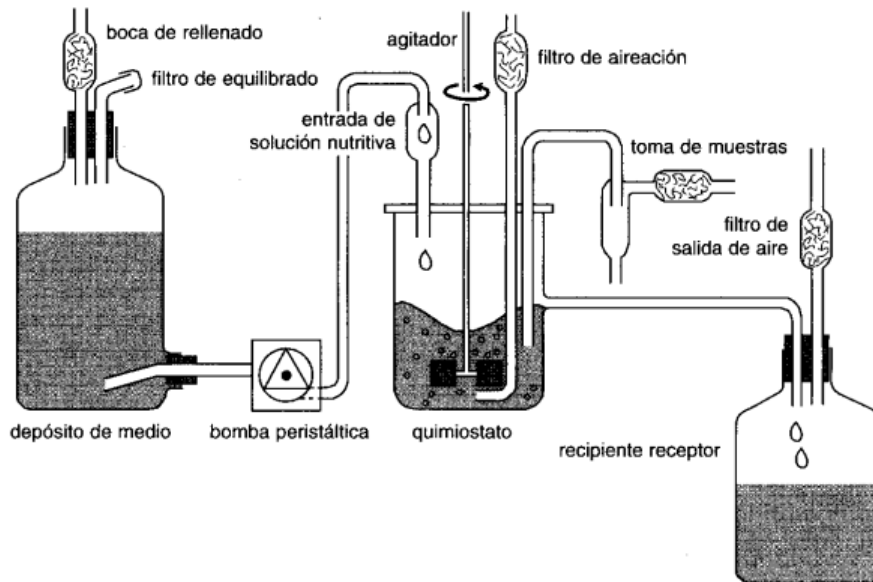
$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s} \frac{1}{1 + p/K_i}$$

Crecimiento bacteriano en cultivo continuo

En un cultivo discontinuo se modifican continuamente las condiciones de cultivo; la densidad bacteriana aumenta y la concentración de sustrato disminuye. Sin embargo, para muchas investigaciones fisiológicas parece deseable mantener las células lapsos largos de tiempo con una misma concentración de sustrato y con unas condiciones ambientales también constantes, dejándolas crecer exponencialmente. Mediante una rápida y repetida transferencia de las células a un nuevo caldo de cultivo se pudo llegar a condiciones aproximadamente de este tipo. El objetivo se alcanza por una vía más sencilla si a una población bacteriana en crecimiento se le añade continuamente medio nuevo y se va eliminando suspensión bacteriana en la misma magnitud. La base de este procedimiento es el cultivo continuo, tal como se realiza en el **quimiostato** o en el **turbidostato**.

Crecimiento en el quimiostato

El quimiostato está compuesto por un recipiente de cultivo al que afluye un flujo constante de medio de cultivo de un recipiente de reserva. Por aireación y agitación mecánica se consigue en el recipiente de cultivo un suministro óptimo de oxígeno y una distribución homogénea lo mas rápida posible de los nutrientes contenidos en el medio que va entrando. En la misma medida que entra medio de cultivo en el recipiente de cultivo, va saliendo suspensión bacteriana.



Principio del cultivo continuo en un quimiostato.

Si el volumen del recipiente de cultivo es V (litros) y el medio de cultivo fluye con un *flujo* f (l/h), la *tasa de dilución* es $D = f/V$. D indica por tanto, el cambio de volumen o renovación por hora. Si en el momento de poner en marcha el quimiostato las bacterias que se encuentran en el recipiente de cultivo (x [g/l]) no creciesen, se irían eliminando del recipiente según una *tasa de lavado*:

$$D \cdot x = - \frac{dx}{dt}$$

La densidad bacteriana en el cultivo iría disminuyendo exponencialmente según $x = X_0 \cdot e^{-Dt}$

El crecimiento de las bacterias en el recipiente de cultivo tiene lugar igualmente de forma exponencial. La tasa de incremento viene dada por la expresión $\mu X = dx/dt$, y la densidad bacteriana aumenta exponencialmente según $x = X_0 \cdot e^{\mu t}$.

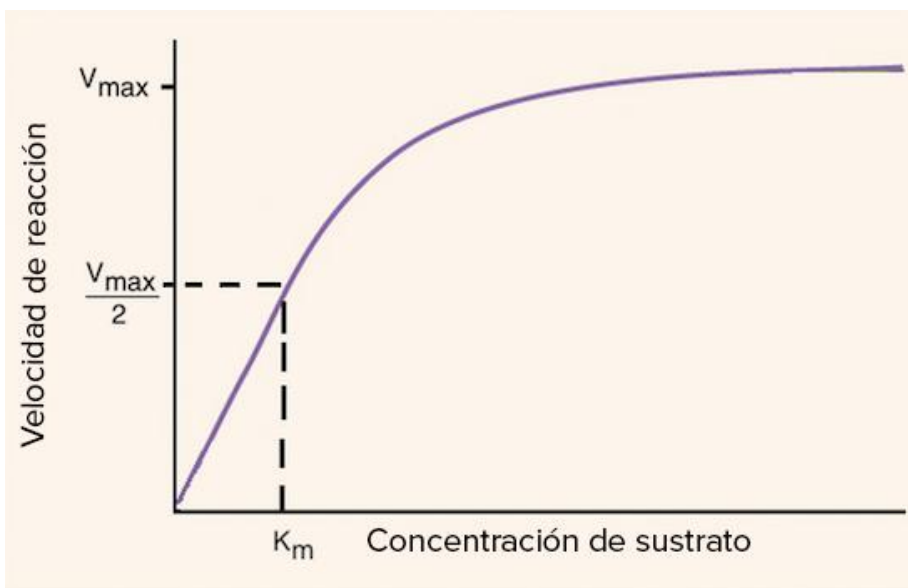
La tasa de modificación de la densidad bacteriana dx/dt en el recipiente de cultivo viene dada por las dos velocidades citadas $dx/dt = \mu x - Dx$.

Si la tasa de crecimiento μ y la tasa de dilución D son iguales, la pérdida por lavado se iguala al crecimiento bacteriano, esto es, la modificación es nula, y la densidad bacteriana x se mantiene constante. Bajo estas condiciones el cultivo se encuentra en un "**equilibrio dinámico**"; la multiplicación exponencial de las células esta compensada por un proceso exponencial negativo.

El cultivo en el quimiostato está controlado por el sustrato. La estabilidad del sistema se basa en esta limitación de la tasa de crecimiento por la concentración de uno de los sustratos imprescindibles para el crecimiento (dador de H; fuente de N, S o P). Si a través de la limitación por sustrato se consigue que la tasa de crecimiento real μ sea menor que la tasa de crecimiento máxima alcanzable 'con el sustrato saturante, μ_{max} , entonces la tasa de dilución puede variarse en un amplio margen sin que las bacterias resulten lavadas. De todos modos, la tasa de dilución D no puede sobrepasar a μ_{max} .

La dependencia de la tasa de crecimiento μ con respecto a la concentración del sustrato c sigue una curva de saturación (Fig.). Por lo general las bacterias crecen ya a pequeñas concentraciones del sustrato (p. ej. 10 mg glucosa/l en el medio) con una tasa máxima. Tan solo a concentraciones de sustrato inferiores μ es dependiente de la concentración. K_m es entonces la concentración para la cual la tasa de crecimiento tiene un valor semi máximo ($\mu = \mu_{max}/2$). K_m es junto a μ_{max} un parámetro fundamental del crecimiento de las bacterias en el quimiostato.

En la gráfica, $\mu = V$



La concentración de sustrato en el recipiente de cultivo, y por tanto en la suspensión que sale de él es prácticamente cero a tasas de dilución bajas en un amplio margen. Sólo cuando la tasa de dilución se acerca a la tasa de crecimiento máxima se lava conjuntamente parte del sustrato; por último, la concentración de sustrato alcanza en la salida a la del medio que entra.

La estabilidad del equilibrio dinámico en el quimiostato se basa en la limitación de la tasa de crecimiento por un sustrato. La tasa de crecimiento μ se mantiene a nivel bajo. El quimiostato puede manejarse fácilmente como un sistema autorregulado; si se establece a lo largo de bastante tiempo una velocidad de flujo constante, el sistema llega a regularse por sí solo.

Crecimiento en el turbidostato.

Frente al cultivo continuo en el quimiostato se encuentra el del turbidostato. Tal como indica su nombre, el funcionamiento se basa en el mantenimiento de una determinada densidad bacteriana o turbidez. Un turbidímetro regula a través de una válvula el flujo de medio de cultivo. En el recipiente de cultivo están todos los nutrientes en exceso, y las bacterias crecen a una tasa próxima a la máxima.

El funcionamiento del turbidostato es técnicamente más complejo que el del quimiostato.

Diferencias básicas.

Entre el cultivo discontinuo clásico y el continuo en el quimiostato existen unas diferencias básicas, que debemos finalmente recalcar una vez más.

El **cultivo discontinuo** hay que verlo como un sistema cerrado (en cierto modo como un organismo pluricelular), que en su desarrollo cumple con una fase de latencia, una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de muerte (juventud, madurez, vejez y muerte). En cada momento reinan condiciones de cultivo distintas. Es casi imposible una automatización en un cultivo discontinuo.

El **cultivo continuo** representa un sistema abierto, que tiende hacia un "equilibrio dinámico". El factor tiempo está excluido hasta cierto punto.

Para los organismos reinan siempre las mismas condiciones ambientales.

El aparato puede automatizarse fácilmente.