

The background image shows a laboratory or industrial setting with three large, vertical, stainless steel bioreactors. They are connected by a network of blue pipes and have yellow safety railings around them. The bioreactors are numbered 0, 2, and 3. The scene is dimly lit, with some overhead lights visible.

CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA OBTENER UN CULTIVO A ALTA DENSIDAD CELULAR

Ortega M. C., Melchy A. O., Martínez R. A.,
Gómez G. O., de la Torre M. M.

Cinvestav-IPN, Av. IPN, # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360,
Ciudad de México, México.; cortega@cinvestav.mx.

RESUMEN

En el presente trabajo, se estableció un cultivo por lote alimentado de *Saccharomyces cerevisiae* para obtener alta densidad celular. Se utilizó un biorreactor de tanque agitado de esterilización *in situ* marca Chemap de volumen nominal de 30 litros. Para la estrategia de alimentación se aplicó el método de modelo adelantado con parámetros cinéticos determinados previamente iniciando con un volumen de 16 litros y una edad de 16 h. Se logró obtener una densidad celular de 120 g/l evitando de esta manera el efecto Crabtree.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, cultivo por lote alimentado, alta densidad celular, formación aeróbica de etanol.

ABSTRACT

In the present work, a fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* was established to obtain high cell density. Chemap brand stirred tank bioreactor of sterilization *in situ* with a nominal volume of 30 liters was used. For fed strategy, the advanced model method was used with kinetic parameters previously determined and starting volume of 16 liters at 16 h. We obtained 120 g/l of cell density avoiding in such way the Crabtree effect.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, fed-batch culture, high cell density, ethanol aerobic synthesis.

INTRODUCCIÓN

El proceso de fermentación por lote alimentado se utiliza para prevenir o minimizar la inhibición del crecimiento asociada a la producción aeróbica de etanol¹ (efecto Crabtree) como consecuencia de una elevada concentración de sustrato, además esta técnica es aprovechada para obtener una alta concentración celular³. Al mantener una velocidad específica de crecimiento baja, se evita la producción de etanol. La solución para la etapa de alimentación debe ser lo más concentrada posible para reducir el efecto de dilución.

La alimentación se incrementa exponencialmente considerando una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$, hasta alcanzar un punto en que no sea posible mantener nuestro cultivo sin limitación por transferencia de Oxígeno, (alimentación máxima), a

partir de este momento, la alimentación se mantendrá constante¹. Al considerar el modelo adelantado, se logra mantener una velocidad específica de crecimiento constante para minimizar la formación de un subproducto no deseado, este modelo se determina con base en el balance de materia y la acción de control es la velocidad de alimentación de sustrato. Existe cierto flujo de fuente de carbono y energía, (FCE), que se destina al mantenimiento celular y es proporcional a la cantidad de biomasa.

OBJETIVO

Desarrollar una estrategia de alimentación simple para un proceso por lote alimentado⁴ de *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de controlar la velocidad específica de crecimiento, además evitar se presente el efecto Crabtree y lograr una alta concentración celular.

DESARROLLO

Se empleó un cultivo puro de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) y sacarosa como sustrato en un medio de cultivo similar al descrito por Verduyn². Los procesos de fermentación se realizaron en un biorreactor Chemap de 30 litros, como se muestra en la figura 1.

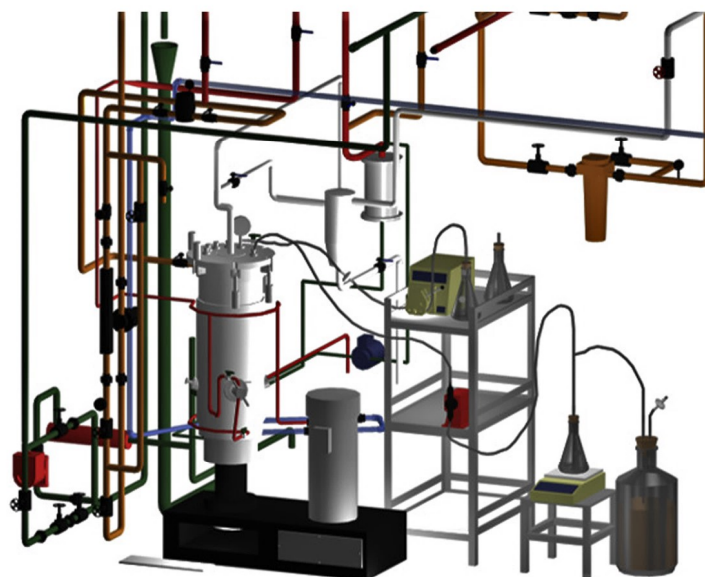


Figura. 1. Reactor Chemap de esterilización *in situ*.

Lote

La etapa en lote se inicia con un volumen de 16 litros y $0.25 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ l}^{-1}$, y con una concentración de sustrato de $10.48 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ l}^{-1}$, en el transcurso de las primeras siete horas de edad del cultivo, la sacarosa

prácticamente se agotó, ($0.44 \text{ g}_{\text{sacarosa}} \text{ l}^{-1}$), mientras que la concentración de biomasa se incrementó hasta los $2.8 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ l}^{-1}$, sin embargo a esa edad, también se determinó una concentración para etanol de $3.1 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ l}^{-1}$, se continúa esta etapa hasta que disminuye la concentración de etanol hasta un valor menor o igual a $1.0 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ l}^{-1}$, condición que se cumple a las 15 horas de edad.

Balance de materia

$$\frac{dC}{dt} = \frac{F}{V} (C_{sa} - C_s) - q_s C_x = 0 \quad \text{_____ 1}$$

C_s	Concentración de sustrato	Kg m^{-3}
C_{sa}	Concentración Sustrato en alimentación	Kg m^{-3}
F	Flujo de alimentación	$\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$
V	Volumen	m^3
Q_s	Vel. esp. consumo de sustrato	$\text{Kg}_s \text{ Kg}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$
C_x	Concentración de biomasa	Kg m^{-3}

Si $C_s \ll C_{sa}$, la ecuación 1 se puede simplificar:

$$\frac{F}{V} C_{sa} - q_s C_x = 0; \quad \frac{F C_{sa}}{V} = q_s C_x; \quad F C_{sa} = q_s C_x V$$

$$F = \frac{q_s C_x V}{C_{sa}} \quad \text{_____ 2}$$

Pero si $(C_x V)$ se incrementa con el tiempo, F también aumentará de forma exponencial con el tiempo, así:

$$(C_x V)_t = (C_x V)_0 e^{\mu t} \quad \text{_____ 3}$$

Donde 0 y t denotan los valores iniciales y al tiempo t , respectivamente, el flujo de alimentación está en función al tiempo, de tal manera que las células están habilitadas para su crecimiento a una μ constante, al combinar las ecuaciones 2 y 3, se obtiene:

$$F_t = \frac{q_s}{C_{sa}} (C_x V)_t; \quad F_t = \frac{q_s}{C_{sa}} (C_x V)_0 e^{\mu t}$$

Que puede escribirse como:

$$F_t = F_0 e^{\mu t} \quad \text{_____ 4}$$

El rendimiento se define como

$$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s}$$

Sin embargo, este rendimiento disminuye cuando la μ es muy baja, debido a la demanda de sustrato con fines de mantenimiento, (m_s), de tal manera que la velocidad específica de consumo de sustrato al considerar el mantenimiento es:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \quad \text{_____ 5}$$

Por lo tanto, la ecuación para determinar el flujo inicial es

$$F_0 = \left[\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s \right] \left[\frac{C_{x0} V_0}{C_{sa}} \right] e^{\mu t} \quad \text{_____ 6}$$

μ	0.18	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}
$Y_{x/s}$	0.5	Rendimiento	$\text{g}_{\text{cel}} \text{ g}_{\text{sac}}^{-1}$
m_s	0.02736	Sustrato para mantenimiento	$\text{g}_{\text{sac}} \text{ g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$
C_{x0}	3.92	Concentración celular inicial	g l^{-1}
V_0	16	Volumen inicial	l
C_{sa}	540	Concentración de sustrato en alimentación	g l^{-1}
t	0	Edad del cultivo	h
q_s	0.37	Velocidad específica de consumo de sustrato	$\text{g}_{\text{sac}} \text{ g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Transformada de Laplace⁵. Es una técnica matemática que se utiliza para cambiar una función con una variable en otra función con otra variable, además se pueden resolver ecuaciones diferenciales lineales o de orden "n" con coeficientes constantes, básicamente es útil para resolver algunas ecuaciones diferenciales por medios algebraicos.

Aplicando la *transformada de Laplace*, para tener funciones con dominio de frecuencia en lugar de dominio de tiempo, tenemos:

$$F_t = F_0 e^{\mu t}$$

Cuando $D \ll \mu$, se puede considerar $a = \mu$, por definición la *transformada de Laplace* es:

$$\mathcal{L}\{f(t)\} = \int_0^{\infty} e^{-st} f(t) dt$$

Sustituyendo nuestra función:

$$\mathcal{L}\{e^{at}\} = \int_0^{\infty} e^{-st} e^{at} dt$$

$$\mathcal{L}\{e^{at}\} = \int_0^{\infty} e^{(a-s)t} dt$$

Su integral indefinida o antiderivada es:

$$\mathcal{L}\{e^{at}\} = \frac{1}{a-s} \lim_{a \rightarrow \infty} [e^{(a-s)t}]$$

$$\mathcal{L}\{e^{at}\} = \frac{1}{a-s} [e^{(a-s)t}]_0^{\infty} = \frac{1}{a-s} [0 - 1]$$

$$\mathcal{L}\{e^{at}\} = \frac{1}{s-a}$$

El modelo propuesto para el control de alimentación es:

$$F_t = F_0 \left(\frac{1}{s-a} \right) \quad \text{—————} 7$$

Considerando la constante de Laplace ($s = 1$), así como una $\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$. El flujo de alimentación para la segunda hora es:

$$F_1 = F_0 \left(\frac{1}{1-0.18} \right) = 0.45(1.2195) = 0.055 \text{ lh}^{-1}$$

Lote alimentado

A las 15 horas de edad se inicia esta etapa, se incrementa el flujo de alimentación de forma exponencial con el objetivo de mantener la velocidad específica de crecimiento en $\mu = 0.18 \text{ h}^{-1}$. A las 30 horas de edad ha sido necesario incrementar la velocidad de agitación, desde 350 rpm ($KLa = 48 \text{ h}^{-1}$), hasta 810 rpm, ($KLa = 198 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, la concentración de Oxígeno disuelto es crítica por lo que se decide en adelante mantener constante el flujo de alimentación.

Saccharomyces cerevisiae

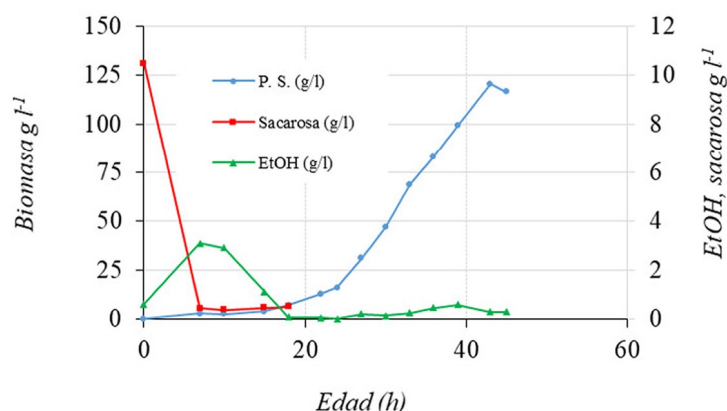


Figura 2. Cinética de crecimiento del cultivo por lote alimentado de *Saccharomyces cerevisiae* a alta densidad celular. P. S. corresponde al peso seco.

CONCLUSIONES

El modelo propuesto para el lote alimentado es válido, se evita el efecto Crabtree y al concluir el proceso, se alcanza una concentración de biomasa aproximada a 120 g l^{-1} .

El criterio para iniciar la etapa de alimentación es que la concentración de etanol sea igual o menor a 1.0 g l^{-1} . Se controló el flujo de alimentación para mantener una velocidad específica de crecimiento constante en 0.18 h^{-1} .

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pham H., Larsson G., Enfors S. (1988). Aerobic Fed-Batch Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model Verification. *Biotechnol. Bioeng.* 60 (4) 474-482.
2. Verduyn C., Postma E., W. ALEXANDER Scheffers A., and Van Dijken J. (1992). Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: A Continuous-Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation. *YEAST VOL. 8*: 50 1-5 17.
3. Van Hoek P., de Hulster E., Van Dijken J., Pronk J. (2000). Fermentative Capacity in Fed-Batch Cultures of Baker's Yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 68 (5) 517-523.
4. Pirt S. J., (1975), Principles of microbe and cell cultivation. New York: Wiley.
5. Murray R. S., (198), Manual de formulas y tablas matemáticas. McGraw-Hill/Interamericana de México S.A. de C. V.