

ANEXO 6

CINÉTICA

6.1 Introducción

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para fabricar nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota, este sería el sustrato limitante. Consecuentemente el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por las mismas células como puede ser una alta concentración de alcohol.

Si se supone que en este caso se detiene el crecimiento a causa del agotamiento del sustrato limitante, se puede considerar dos aspectos fundamentales que definen al crecimiento microbiano. Estos aspectos serían, por un lado el estequiométrico, ya que la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y por la otra parte el de tipo cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

6.2 Crecimiento celular

Antes del inicio de la fermentación, el medio de cultivo contiene una gran cantidad y variedad de microorganismos como mohos, bacterias, levaduras, esporas e incluso protozoos. Sin embargo, son las levaduras y bacterias las que empiezan a sobrevivir y multiplicarse en este medio, aún cuando las bacterias permanecen durante gran parte del proceso en estado latente.

Inicialmente el mosto es un medio adecuado para el crecimiento y poco a poco se va volviendo inhóspito debido a la disminución de azúcares y nutrientes y al incremento de la concentración de alcohol.

Cuando el medio es favorable, las levaduras se multiplican por vía vegetativa asexual durante la mitosis, mientras que al final de la fermentación alcohólica, comienzan a reproducirse sexualmente por meiosis, señal de que el medio de vida es muy desfavorable como consecuencia de la falta de nutrientes.

En el metabolismo celular, no todo el sustrato es consumido para la formación de nueva biomasa, sino que parte se emplea para el mantenimiento celular, otra para la producción de producto y otra parte se dirige al desarrollo celular. Por esto, surge el concepto de rendimiento global estequiométrico (teórico) y el aparente.

El rendimiento estequiométrico se define como la cantidad de biomasa o producto formado por la cantidad de sustrato consumido con esa finalidad. El rendimiento estequiométrico sería la cantidad de biomasa o producto presente entre la cantidad total de sustrato consumido.

El rendimiento teórico es difícil de hallar ya que el proceso es complejo y no se puede averiguar qué cantidad de sustrato va dirigido a la formación de nuevas células y a sus funciones vitales.

El crecimiento celular consta de cuatro fases, la primera se refiere a la fase de latencia, donde las células permanecen inactivas. La segunda fase es la de crecimiento exponencial, el medio rico en nutrientes propicia tal desarrollo hasta llegar hasta la tercera fase. Esta es la fase estacionaria, en ella el número de células que crecen nuevas es igual al número de células que perecen. La última fase corresponde con un medio hostil donde se carece de alimento para el desarrollo de la biomasa y se llega a la muerte de tales organismos.

Para el caso del microorganismo escogido y el proceso a desarrollar, estas fases se dan entre 72 horas y 96 horas. Ya que también hay que contar que la muerte de tales microorganismos no sólo se debe a la escasez de nutrientes sino a la elevada concentración de alcohol.

En la siguiente gráfica se puede apreciar tales fases, en discontinuo.

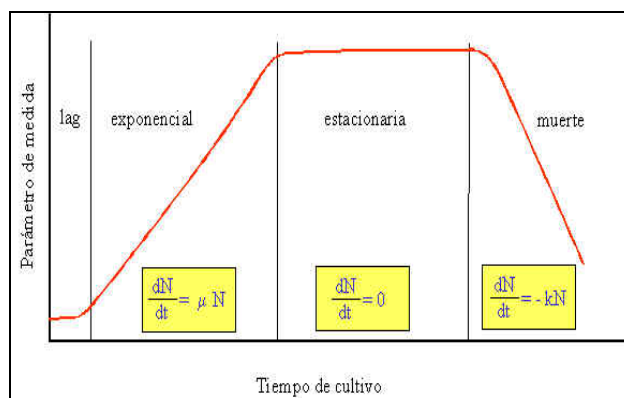
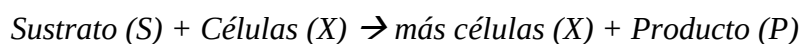


Fig.30 Fases del crecimiento celular.

6.3 Cinética del crecimiento celular

A pesar de que el crecimiento de las células es un fenómeno muy complejo, a menudo se puede obtener una descripción global buena del mismo a través de ecuaciones relativamente sencilla. Entre ellas la más usada es la ecuación de Monod. Esta ecuación describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante y se puede expresar de la siguiente manera:



$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

Donde r_x es la velocidad de crecimiento de las células, μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento y K_s es la constante de Monod.

Es bastante común expresar la ecuación en función de la velocidad específica de crecimiento:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S}$$

En la cual μ_m es el máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento cuando $S \gg K_S$ y las concentraciones del resto de nutrientes no han cambiado de forma considerable.

K_S es el valor de la concentración del nutriente limitante a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima. Para valores de S inferiores a K_S , la velocidad de crecimiento depende de una forma lineal de S , mientras que para valores superiores, el valor de μ se hace independiente de S .

Uno de los inconvenientes que plantea el uso de la ecuación de Monod es la correcta determinación del valor de K_S , ya que este es normalmente muy pequeño y no es fácil de averiguar.

La ecuación de Monod es muy simple y no siempre permite obtener una buena representación de los datos de crecimiento de un microorganismo. Por ello se han desarrollado otros modelos más complejos basados en este.

El modelo de Monod describe sólo a los periodos de crecimiento exponencial y a la fase estacionaria.

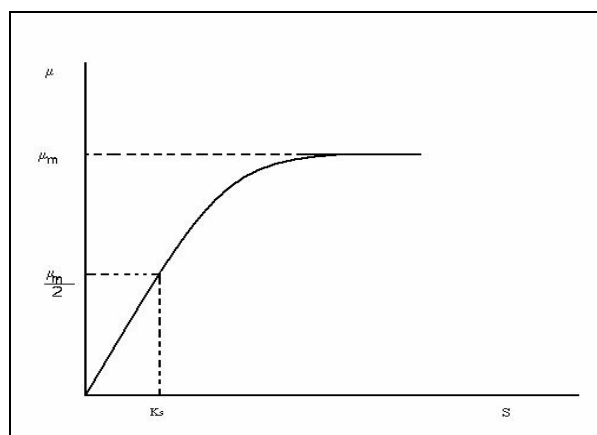


Fig.31 Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según la ecuación de Monod.

En términos más complejos se puede usar la ecuación logística, es un modelo sencillo donde se considera que la velocidad de crecimiento de las células sólo depende de la concentración de las células pero incluye además un término de inhibición proporcional al cuadrado de la concentración de biomasa.

$$\frac{dX}{dt} = kX - \beta X^2$$

Donde k es un término análogo al de la ecuación de Malthus y β es una constante del término de inhibición.

6.4 Rendimientos

Como se dijo anteriormente los rendimientos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, usualmente referidos a la fuente de carbono y energía. El rendimiento celular se define a través del concepto de nutriente limitante.

Un nutriente limitante es aquel sustrato que cuyo consumo controla la velocidad de producción de biomasa. Es decir que la velocidad de crecimiento celular es función de

tal nutriente. En muchos casos existen más de un nutriente u otros factores que intervienen en dicha velocidad, pero para simplificar se considera siempre que sólo uno es el esencial y el más importante.

A través de este concepto de sustrato limitante se puede definir el rendimiento del proceso.

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa Pr oducida}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{gX \text{ sec } a}{gS \text{ consumido}}$$

[3]

El sustrato normalmente es la fuente de carbono. El rendimiento está en función de tal fuente de Carbono usada y las condiciones del proceso. Puede variar durante el proceso.

El consumo de sustrato no está dedicado sólo a la producción de biomasa.

Éste tiene tres cometidos, para asimilación de los microorganismos como material celular, provisión de energía para la síntesis celular y energía para el mantenimiento del cultivo.

Entonces la siguiente ecuación representa el consumo total del sustrato:

$$\Delta S = (\Delta S)_{MC} + (\Delta S)_C + (\Delta S)_M$$

[4]

Sustrato total = Sustrato empleado asimilación materia celular + Provisión Energía síntesis celular + Energía mantenimiento cultivo

Con la ayuda de la ecuación 3 y la 4 se tiene:

$$\frac{\Delta S}{\Delta X} = \frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}} = \frac{(\Delta S)_{MC}}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_C}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_M}{(\Delta X)}$$

El rendimiento teórico se define como $\Delta X / (\Delta S)_{MC}$ que es el sustrato empleado en la asimilación de los microorganismos como material celular. También se llama el rendimiento del crecimiento. Este rendimiento permanece constante si la composición celular se mantiene constante.

Sin embargo el rendimiento global dependerá de la fracción de sustrato consumido en cada una de las actividades celulares.

El rendimiento definido mediante la ecuación 1 se refiere al rendimiento celular, existen otros rendimientos referidos a otros parámetros del proceso o en función de otras variables. Estos pueden ser como los que siguen a continuación:

$$Y_{\frac{X}{O}} = \frac{\Delta X}{\Delta O} = \frac{\text{Biomasa Pr oducida}}{\text{Consumo Oxígeno}} = \frac{gX \text{ sec } a}{gOxígenoConsumido} = \frac{gX \text{ sec } a}{molOxígenoConsumido}$$

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Producto Producido}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{g / mol P}{g / mol S \text{ consumido}} \quad (\text{Rendimiento del producto})$$

$$Y_{\frac{C}{S}} = \frac{\Delta C}{\Delta S} = \frac{CO_2 \text{ Producido}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{Mol CO_2 \text{ Producido}}{Mol S \text{ Consumido}}$$

$$\text{Tasa Crecimiento Molar} = \frac{g X \text{ sec } a}{Mol S \text{ consumido}}$$

Con todo esto se puede escribir la siguiente ecuación:

$$r_s = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}}\right)r_x = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{P}{S}}}\right)r_p = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{C}{S}}}\right)r_c$$

Donde r_s (mol S/m³s) es la velocidad de desaparición de sustrato, r_x (mol X/m³s) es la velocidad de aparición de biomasa, r_p (mol P/m³s) es la velocidad de aparición de producto y r_c (mol CO₂/m³s) es la velocidad de aparición de CO₂.

Otra manera de definir el rendimiento es a través del calor o la energía de reacción generada por el consumo de sustrato. La generación de calor es el resultado del metabolismo energético y de crecimiento, por ello existe una relación entre el calor producido y la energía utilizada del sustrato.

Se introduce un nuevo factor de rendimiento, Y_{Δ} (gramos de biomasa/calorías generada)

$$Y_{\Delta} = \frac{Y_{\frac{X}{S}}}{\Delta H_s - Y_{\frac{X}{S}} \Delta H_c}$$

Donde ΔH_s y ΔH_c son las entalpías de combustión del sustrato y del material celular respectivamente.

Esta ecuación representa un balance aproximado de energía para un crecimiento aerobio. Los valores de Y_{Δ} dependen de la especie celular concreta y del tipo de sustrato consumido.

En la siguiente tabla se pueden ver algunos rendimientos celulares sobre la melaza como fuentes de carbono.

Tabla 4. Rendimientos característicos de la melaza

Sustrato	$Y_{X/S}$	$Y_{X/O}$	Y_{Δ}
Glucosa, melaza, almidón	0,51	1,47	0,42

En definitiva, los rendimientos que se aplicarán en este proceso en cuestión serán los referidos al crecimiento celular y el producto obtenido, todo ello respecto del consumo de sustrato. Es decir, que a través de tales rendimientos se obtendrá el aprovechamiento de los nutrientes para la obtención de etanol.

6.5 Cinética del consumo de sustrato

El sustrato consumido por el microorganismo tiene como finalidad el crecimiento celular, mantenimiento de las actividades vitales y la generación de producto, para el caso donde la formación de producto no esté asociada de forma directa al metabolismo energético.

Para modelar la variación de la concentración del sustrato con el tiempo se proponen diversas ecuaciones.

La primera es la más utilizada pero no es siempre aplicable. Por ello aparecen las demás ecuaciones.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} \rightarrow \text{Sin formación de producto y sin mantenimiento}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - m_x X \rightarrow \text{Sin formación de producto}$$

$$\frac{dS}{dt} = -m_x X \rightarrow \text{Sin formación de biomasa ni de producto}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{\frac{p}{x}}} \frac{dP}{dt} \rightarrow \text{Sin mantenimiento celular}$$

La ecuación cinética global será:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{\frac{p}{x}}} \frac{dP}{dt} - m_s X$$

6.6 Cinética de formación de producto

De manera análoga al modelo cinético de consumo de sustrato se plantean diferentes ecuaciones para modelar la formación de producto.

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{\frac{p}{s}} \frac{dS}{dt}$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{\frac{p}{x}} \frac{dX}{dt}$$

Y mediante el uso de las dos ecuaciones anteriores se obtiene el modelo de Luediking-Piret, parcialmente asociado al crecimiento.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

La evolución del producto, del sustrato y de la biomasa conforme transcurre el tiempo dentro del proceso la muestra la siguiente gráfica.

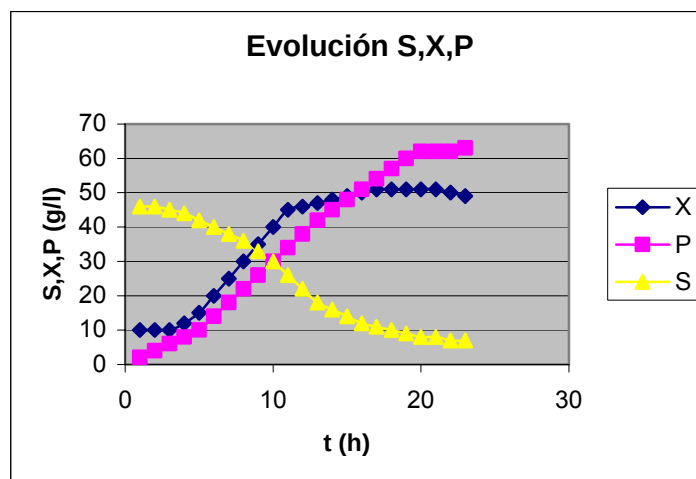


Fig.32 Evolución del sustrato, de la biomasa y del producto respecto el tiempo