

## TRANSFERENCIA Y CONSUMO DE OXÍGENO EN EL CULTIVO DE ALTA DENSIDAD DEL MICROORGANISMO CON ACTIVIDAD BIONEMATICIDA TSUKAMURELLA PAUROMETABOLA, C924

Nemecio González\*, Jesús Zamora\*, Luís Ramos\*\*, Eikel Pérez\*, Carlos Pérez\*, Eladio Salazar\*

\*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Camagüey, Cuba, \*\*Universidad de Camagüey

*En el presente trabajo se evalúa la transferencia y el consumo de oxígeno, para establecer un cultivo de alta densidad de la bacteria Tsukamurella paurometabola, C924, agente activo del bionemático HeberNem. Se determinó la influencia de la agitación y la aireación en el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ). Se obtuvo una velocidad específica de consumo de oxígeno igual a  $12,53 \text{ mg de O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ células secas h}^{-1}$ , empleando el método de modelación del proceso. A presión atmosférica con las condiciones de agitación y aireación determinadas se pueden obtener  $94 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca sin limitación de oxígeno. Mediante la ley de Henry se determinó que se pueden obtener  $150 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca a  $1,5 \text{ bar}$  de presión, sin inhibición por oxígeno. Esta estrategia se corroboró a escala productiva de  $200 \text{ L}$ . Se obtuvo  $139 \pm 8 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca al final del cultivo. El estudio de la transferencia y el consumo de oxígeno posibilitó establecer un cultivo de alta densidad del microorganismo Tsukamurella paurometabola, C924 sin limitaciones de este sustrato.*

**Palabras clave:** transferencia de oxígeno, consumo de oxígeno, bionemático, cultivo de alta densidad, tsukamurella paurometabola.

*Oxygen transfer rate and oxygen uptake was evaluated in the high cell density culture of Tsukamurella paurometabola. This bacterium is a active agent of bionematocide HeberNem. Influence of impeller speed and aeration in the oxygen transfer rate coefficient ( $K_L a$ ) was determined. Oxygen uptake rate obtained was  $12,53 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry cells h}^{-1}$ . At determined agitation and aeration conditions, dry cell concentration of  $94 \text{ g L}^{-1}$  may be obtained without oxygen limitations. Applying Henry's law was determined that the pressure should be equal to  $1,5 \text{ bar}$ . to obtain  $150 \text{ g L}^{-1}$  of dry biomass without oxygen limitation. This strategy was corroborated at  $200 \text{ L}$  bioreactor scale.  $139 \pm 8 \text{ g L}^{-1}$  of dry cell biomass weight was obtained at the end of culture. Oxygen transfer and uptake study helped to design a high cell density culture of Tsukamurella paurometabola C924 without oxygen limitations.*

**Key words:** oxygen transfer, oxygen uptake, bionematocide, high cell density culture, tsukamurella paurometabola.

### Introducción

El uso de microorganismos en el control de fitonemátodos, ha sido una de las alternativas para la disminución del uso de productos químicos tóxicos al medio ambiente. En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba, se ha desarrollado el bionemático HeberNem, cuyo componente activo es la bacteria Tsukamurella paurometabola, cepa C-924 /1/. Para establecer un proceso productivo a escala industrial económicamente factible se necesita desarrollar un cultivo de alta densidad celular, que posibilite incrementar la productividad del sistema fermentativo.

En el establecimiento de un cultivo de alta densidad hay que satisfacer todos los requerimientos nutricionales del microorganismo. En muchos cultivos, específicamente en los cultivos de alta densidad, la concentración de oxígeno disuelto se convierte en el nutriente limitante, por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno pasa a ser el paso limitante del crecimiento microbiano. El oxígeno tiene una baja solubilidad en el agua, por lo que debe ser alimentado continuamente en los cultivos aerobios. Tanto la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO), como la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) se deben estudiar en el diseño de los procesos fermentativos para incrementar la productividad /2, 3, 4/.

Se han descrito diferentes métodos para la determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno. El método dinámico es uno de los más empleados, /5/. Existen diferentes técnicas experimentales para determinar la velocidad de consumo de oxígeno: el método dinámico /4, 6/, el balance de masa en la fase gaseosa (por las mediciones de la concentración de oxígeno en la entrada y la salida) /7/ o técnicas especiales en aparatos específicos /8, 9/.

La modelación de la cinética de la concentración de oxígeno es esencial para el establecimiento del proceso fermentativo. Esta modelación se hace teniendo en cuenta tanto la VTO, como la VCO. Pirt /10/ describe que la VCO se relaciona con el crecimiento celular y con el mantenimiento celular.

Santos y colaboradores demostraron que existen discrepancias en los coeficientes de conversión de oxígeno en biomasa y en el coeficiente de mantenimiento celular determinado por los métodos dinámico y de modelación del proceso. Cuando la VCO se determina por el método dinámico las células se comportan de una forma diferente, debido a que al disminuir bruscamente la concentración de oxígeno disuelto, se reprimen algunas funciones celulares disminuyendo la actividad metabólica. Por este motivo. Santos y colaboradores han sugerido el empleo de la modelación del proceso como método para determinar la VCO. /11/.

El objetivo del presente trabajo, es evaluar la transferencia y el consumo de oxígeno para establecer un cultivo de alta densidad de la bacteria *Tsukamurella paurometabola*, C924, agente activo del bionematicida HeberNem.

## Materiales y métodos

**Microorganismo.** Se empleó el microorganismo *Tsukamurella paurometabola*, cepa C-924, aislado del suelo.

**Condiciones de cultivo.** Se empleó el medio de cultivo semi definido SD /16/, que tiene como fuentes de carbono Extracto de Levadura y Sacarosa. El cultivo se realizó en fermentadores de tres litros (B.E. Marubishi) y de 200 L (Chemap) La temperatura de cultivo fue de 36 °C y el pH se controló a 6,6.

**Técnicas analíticas.** La concentración celular se determinó por peso seco en balanza de peso seco Sartorius MD30A. La concentración de oxígeno se determinó con la ayuda de un sensor polarográfico de oxígeno marca Ingold. La concentración de sacarosa se determinó por el método Fenol Sulfúrico /12/ y los aminoácidos del extracto de levadura por método colorimétrico empleando ninhidrina. /13/

**Determinación de la VTO.** Se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ ) por el método dinámico. /5/ Se detuvo la inyección de aire y se inyectó nitrógeno gaseoso para desplazar el oxígeno disuelto. Posteriormente se reanudó la inyección de aire a las condiciones deseadas y se midió la variación de oxígeno en el tiempo. La ecuación de balance de masa para el oxígeno es de la siguiente forma:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = VTO - VCO \quad (1)$$

Para las condiciones descritas anteriormente y sin la presencia de microorganismos  $VCO=0$ , por lo que la variación de oxígeno en estas condiciones es:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_{La}(C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad (2)$$

El  $K_{La}$  se determinó por la pendiente de la recta  $\ln(C_{O_2}^* - C_{O_2})$  vs t.

Se realizó un diseño factorial 32 para determinar la influencia de la velocidad de agitación (niveles 8, 12 y 15 s<sup>-1</sup>) y del flujo volumétrico de aire por unidad de volumen (0.5, 1 y 1.5 vvm) en el coeficiente de transferencia de oxígeno.

La concentración saturada de oxígeno durante el equilibrio se determinó por la ley de Henry, con una constante de Henry igual a 5,18 x 10<sup>4</sup> atm mol<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> de agua. Como la concentración media de oxígeno en el aire es 0,21 %, la concentración saturada de oxígeno en el equilibrio en el medio de cultivo es igual a 6,8 mg L<sup>-1</sup> a presión atmosférica.

**Determinación de la VCO.** El consumo específico de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) se determinó por el

método de modelación del proceso descrito por Santos y colaboradores /11/. Para ello se ajusta-

ron los datos experimentales obtenidos al modelo descrito a continuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left( 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (3)$$

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = VTO - VCO = K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} X \quad (4)$$

Las mediciones se realizaron en la fase de crecimiento del microorganismo en sacarosa en el biorreactor de 3 litros a 750 rpm y 1,5 vvm. La concentración saturante de oxígeno empleada fue  $C_{O_2}^* = 6.8 \text{ mg L}^{-1}$ . La integración del sistema de ecuaciones diferenciales se realizó empleando el método Runge Kutta de cuarto orden.

Validación de los resultados. La validación de las condiciones propuestas se realizó a escala productiva de 200L. El crecimiento celular y el consumo de sustratos (aminoácidos y sacarosa) se ajustó al modelo biaxico descrito por Lee y colaboradores /14/. Se emplearon las siguientes ecuaciones diferenciales:

Velocidad de formación de células

$$rX = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\mu = \mu_A + \mu_S$$

$$\mu_A = \mu_{A_{\max}} \frac{C_A}{K_A + C_A}$$

$$\mu_S = \mu_{S_{\max}} \frac{C_S}{(K_S + C_S) \cdot (K_I + C_A)}$$

Velocidad de consumo de sustratos

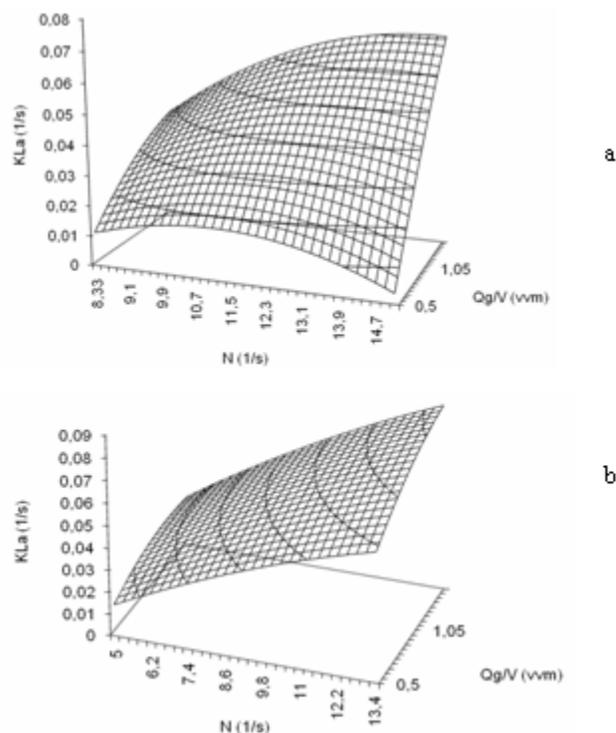
$$rA = \frac{dC_A}{dt} = -a_A \cdot \mu_A \cdot X - m_A \cdot X$$

$$rS = \frac{dC_S}{dt} = -a_S \cdot \mu_S \cdot X - m_S \cdot X$$

## Resultados y discusión

### Influencia de la velocidad de agitación y del flujo de aire por unidad de volumen en el $K_L a$

En la figura 1 se muestran las superficies de respuesta obtenidas en la evaluación de la influencia de la velocidad de agitación y el flujo de aire por unidad de volumen en el  $K_L a$  para los reactores empleados.



**Fig. 1** Influencia de la velocidad de agitación ( $N$ ) y del flujo de aire por unidad de volumen ( $Qg/V$ ) en el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_L a$ ) en el biorreactor de tres litros (a) y de 200 L (b).

El valor máximo de  $K_L a$  se observa para un flujo de aire por unidad de volumen de 1,5 vvm en los dos biorreactores. En cuanto a la velocidad de agitación en el biorreactor de tres litros a partir de  $N=12,5 \text{ s}^{-1}$  (750 rpm) se observa una tendencia a una meseta en la variable respuesta con valores de  $K_L a$  superiores a  $0,064 \text{ s}^{-1}$  ( $225,5 \text{ h}^{-1}$ ). Para obtener este mismo valor en el biorreactor de 200 L se necesita una agitación de  $10,31 \text{ s}^{-1}$  (618 rpm).

### Velocidad específica de consumo de oxígeno

Las condiciones iniciales para la integración de las ecuaciones diferenciales fueron:  $t_0 = 0$ ,  $X_0 = 43 \text{ g L}^{-1}$  y  $o = 0,00328 \text{ g L}^{-1}$ . El coeficiente de correlación obtenido fue  $R^2 = 0,97$ . Como parámetros de ajuste del modelo se obtuvieron los siguientes valores:

$$\mu_{\max} = 0,0756 \text{ h}^{-1} \text{ y } q_{O_2} = 0,01253 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}.$$

Partiendo de las condiciones de cultivo propuestas en el biorreactor de tres litros considerando que

el valor crítico de concentración de oxígeno para el crecimiento de *Tsukamurella paurometabola* C924 es de 25 % de la concentración de oxígeno saturado, entonces  $C_{O_2} = 0,00175 \text{ g L}^{-1}$ . Por tanto la velocidad de transferencia de oxígeno es:

$$VTO = K_L a (C_{O_2}^* - C_{O_2}) = 1,1839 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Con la velocidad específica de consumo de oxígeno obtenida por el método de modelación del proceso ( $q_{O_2} = 0,01253 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e igualando la velocidad de consumo de oxígeno a la velocidad de transferencia de oxígeno se obtiene que la mayor concentración celular sin limitación de oxígeno en el biorreactor de tres litros es  $X = 94,5 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca. Este resultado nos indica que a partir de este valor de concentración de biomasa el oxígeno pasa a ser el sustrato limitante.

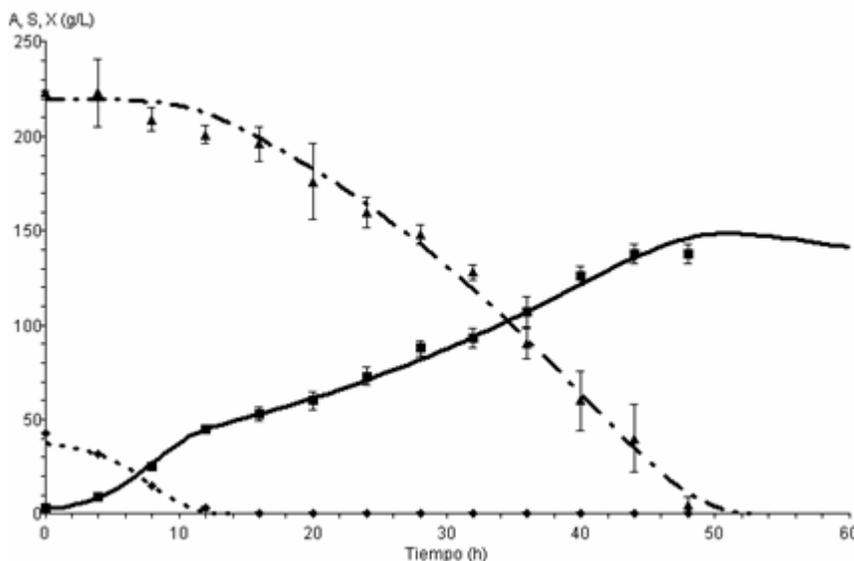
De igual forma, con los mismos datos se obtuvo que para lograr un crecimiento de  $150 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa seca se necesita incrementar la presión dentro del biorreactor a 1,5 bar.

## Validación de los resultados en biorreactor de 200 L

Los resultados obtenidos se validaron en biorreactor de 200 L. Para ello se ajustaron los datos experimentales a un modelo biauxico de

crecimiento, donde primeramente se consumen los aminoácidos del extracto de levadura y posteriormente la sacarosa.

En la figura 2 se muestran los datos de la cinética de crecimiento del microorganismo y el ajuste del modelo biauxico.



**Fig. 2** Determinaciones experimentales de las concentraciones de aminoácidos (♦), sacarosa (▲) y biomasa seca (■) en el tiempo en el biorreactor de 200 L. Los valores obtenidos por el modelo se representan con las líneas: ······ - concentración de aminoácidos, - · - · - · - concentración de sacarosa y ——— - concentración de biomasa seca.

Se puede apreciar que no existe limitación en el crecimiento celular hasta alcanzar el máximo

crecimiento. En la tabla 1 se muestran los parámetros de ajuste del modelo.

Tabla 1

Parámetros de ajuste del modelo de crecimiento biauxico de *Tsukamurella paurometabola* C-924 en aminoácidos y sacarosa en biorreactor de 200 L

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
$\mu_{A_{obs}}$ , [h <sup>-1</sup> ]	0,571 ± 0,004	$\alpha_A$ , [g g <sup>-1</sup> ]	0,92 ± 0,11
$K_A$ , [g L <sup>-1</sup> ]	27,02 ± 0,36	$\alpha_S$ , [g g <sup>-1</sup> ]	1,62 ± 0,04
$\mu_{S_{obs}}$ , [h <sup>-1</sup> ]	0,267 ± 0,003	$m_A$ , [g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,003 5 ± 0,000 7
$K_S$ , [g L <sup>-1</sup> ]	21,39 ± 8,96	$m_S$ , [g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	0,005 6 ± 0,001 4
$K_I$ , [g L <sup>-1</sup> ]	6,13 ± 0,39		

Con las condiciones propuestas se obtuvo un crecimiento máximo de 139 ± 8 g L<sup>-1</sup> de biomasa seca al final del cultivo sin observarse limitación

por oxígeno. Resultados similares, sólo se han obtenido para procesos fermentativos con sistemas continuos o incrementados, pero en condicio-

nes batch las mayores concentraciones celulares que se obtienen son por el orden de 10 a 50 g L<sup>-1</sup> de biomasa seca /15/

## Conclusiones

El estudio de la transferencia y el consumo de oxígeno posibilitó establecer un cultivo de alta densidad del microorganismo *Tsukamurella paurometabola* C-924 sin limitaciones de este sustrato empleando un sistema de cultivo batch.

## Nomenclatura

$K_L a$  Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (s<sup>-1</sup>, h<sup>-1</sup>)  
 $N$  Velocidad angular del impelente (s<sup>-1</sup>, rpm)  
 $\mu$  Velocidad específica de crecimiento celular (h<sup>-1</sup>)  
 $X_{\max}$  Concentración celular máxima (g L<sup>-1</sup>)  
 $X$  Concentración celular (g L<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{\max}$  Velocidad específica de crecimiento máximo (h<sup>-1</sup>)  
 $C_A$  Concentración de aminoácidos (g L<sup>-1</sup>)  
 $C_S$  Concentración de sacarosa (g L<sup>-1</sup>)  
 $K_S$  Parámetro cinético asociado al crecimiento en sacarosa (g L<sup>-1</sup>)  
 $K_A$  Parámetro cinético asociado al crecimiento en aminoácidos (g L<sup>-1</sup>)  
 $K_I$  Constante de inhibición (g L<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{A\max}$  Velocidad específica de crecimiento máximo en aminoácidos (h<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{S\max}$  Velocidad específica de crecimiento máximo en sacarosa (h<sup>-1</sup>)  
 $C_{O_2}$  Concentración de oxígeno disuelto en el medio en condiciones de saturación (g L<sup>-1</sup>)  
 $C_{O_2}$  Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (g L<sup>-1</sup>)  
 $a_A$  Coeficiente de conversión de aminoácidos en biomasa (g g<sup>-1</sup>)  
 $a_S$  Coeficiente de conversión de sacarosa en biomasa (g g<sup>-1</sup>)  
 $Q_g$  Velocidad de flujo volumétrico de aire (m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup>)  
 $Q_{g/VL}$  Flujo volumétrico de gas por unidad de volumen de líquido (m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup>s<sup>-1</sup>)  
 $m_A$  Constante de mantenimiento celular en aminoácidos (h<sup>-1</sup>)  
 $m_S$  Constante de mantenimiento celular en sacarosa (h<sup>-1</sup>)

$VTO$  Velocidad de transferencia de oxígeno (g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)  
 $V$  Volumen de fermentación (m<sup>3</sup>)  
 $VCO$  Velocidad de consumo de oxígeno (g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)  
 $t$  Tiempo (h)  
 $q_{O_2}$  Velocidad específica de consumo de oxígeno (g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)  
 $\mu_A$  Velocidad específica de crecimiento en aminoácidos (h<sup>-1</sup>)  
 $\mu_S$  Velocidad específica de crecimiento en sacarosa (h<sup>-1</sup>)

## Bibliografía

- Mena, J.; Pimentel, E.; Hernández, A. T.; Veloz, L.; Vázquez, R. P.; León, L.; Mencho, J. D.; Ramírez, Y.; Pujol, M., y Borroto, C., *Mechanism of action of Corynebacterium paurometabolum strain C-924 on nematodes*, en *Nematology*, vol. 4, núm. 2, 2002, págs. 287.
- Palomares, L.A.; Lopez, S.; Ramirez, O.T. *Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cells cultures*, en *Biochem. Eng. J.*, vol. 19, 2004, págs. 87–93.
- Schafer, S.; Schradser, J.; Sell, D., *Oxygen uptake rate measurements to monitor the activity of terpene transforming fungi*, en *Process Biochem.*, vol. 39, 2004, págs. 2221–2228.
- Rowe, G.E.; Margaritis, A.; Wei, N., *Specific oxygen uptake rate variations during batch fermentation of Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki HD-1*, en *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, 2003, págs. 1439–1443.
- Linek, V. y Benes, P., *Critical Review and Experimental Verification of the Correct Use of the Dynamic Method for the Determination of Oxygen Transfer in Aerated Agitated Vessels to Water, Electrolyte Solutions and Viscous Liquids*, en *Chemical Engineering J.*, vol. 34, 1987, págs. 11–34.
- Alik, P. C.; Yilgor, P.; Ayhan, P.; Demir, A. S., *Oxygen effects on benzaldehyde lyase production*, en *Chem. Eng. Sci.*, vol. 59, 2004, págs. 5075–5083.
- Carragher, J.M.; McClean, W.S.; Woodley, J.M.; Hack, C. J., *The use of oxygen uptake rate measurements to control the supply of toxic substrates: toluene hydroxylation by Pseudomonas putida UV4*, en *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 28, 2001, págs. 183–188.
- Tremier, A.; de Guardia, C.; Massiani, E.; Paul, J.; Martel, L., *A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted*, en *Biores. Technol.*, vol 96, 2005, págs. 169–180.

- 
9. Deshpande, R.R.; Heinzle, E., *On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors*, en *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, 2004, págs. 763–767.
  10. Pirt, S. J., *Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth*, en *Arch. Microbiol.*, vol. 133, 1982, págs. 300–302.
  11. Santos, V.E.; Galdeano, C.; Gomez, E.; Alcon, A.; Garcia-Ochoa, F., *Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of Rhodococcus erythropolis IGTS8: Modelling and difference in results*, en *Biochemical engineering Journal*. vol. 32, 2006, págs. 198-204.
  12. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. y Smith, F., *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*, en *Anal.Chem.*, vol. 28, 1956, págs. 350.
  13. Yemm, E. W.; Cocking, E. C. y Ricketts, R. E., *The determination of amino-acids with ninhydrin*, en *Analyst*, vol. 80, 1955, págs. 209-214.
  14. Lee, I.; Fredrickson, A. y Tsuchiya, M., *Diauxic growth of Propionibacterium shermanii*, en *Applied Microbiology*, vol. 28, no. 5, 1975, págs. 831 – 835.
  15. Lee, S.Y., *High cell-density culture of Escherichia coli*, en *Trends in Biotechnology*, vol. 14, núm. 3, 1996, págs. 98-105.
  16. Hernandez, A., Weekers, F, Mena, J., Borroto, C., and Thonart, P., *Freeze-drying of the biocontrol agent Tsukamurella paurometabola C-924. Predicted stability of formulated powders*, *Industrial Biotechnology*, vol. 2, 2006, no. 3, págs. 209-212.