

# ESTUDIO COMPARATIVO DE CUATRO SISTEMAS DE PROPAGACION DE LEVADURA CERVECERA POR LOTE ALIMENTADO

## COMPARATIVE STUDY OF FOUR FED-BATCH PROPAGATION SYSTEMS OF BEER YEAST

Caicedo<sup>1</sup> L, Sierra<sup>1</sup> J, Hoyos<sup>2</sup> H.

### RESUMEN

Se realizó la propagación por lotes de levadura cervecera y con base en estos resultados se ajustó un modelo matemático. Se llevaron a cabo cuatro fermentaciones con diferentes técnicas de alimentación y se confrontaron los resultados mediante simulación. Las técnicas estudiadas fueron alimentación puntual, alimentación continua-puntual y de alta densidad. La mayor concentración celular y factor de propagación se presentó con el cultivo de alta densidad. La simulación demostró que la alimentación continua o puntual afecta el comportamiento celular, ya sea sobre la velocidad específica y/o el factor estequiométrico  $Y_x/s$ . Se encontró que la técnica de alta densidad aumenta el factor estequiométrico  $Y_x/s$ .

**Palabras claves :** Propagación, simulación, modelo de crecimiento.

### SUMMARY

Beer yeast was propagated using batch culture, and a mathematical model was fitted to the resulting data. Intermittent, continuous-intermittent, and high-density fed-batch techniques were used. The highest cell yield was found using the high density technique. Simulation also unveiled an effect of the feeding technique on cellular growth rate and yield. The high density technique increased the stoichiometric factor  $Y_x/s$ .

**Keywords:** Propagation, simulation, growth model

### INTRODUCCION

Se ha considerado que uno de los ingredientes más

importantes y frágiles en la fabricación de la cerveza es la levadura, por lo tanto, la propagación, que consiste en obtener a partir de una pequeña cantidad de células una masa celular suficientemente alta que sirva de inóculo a la fermentación final conservando las características específicas y las propiedades que conllevan a producir un producto de calidad uniforme, constituye una de las etapas críticas en el proceso cervecero Piper (1978), Knudsen (1985), Knudsen (1975), Schmitdt et. al (1995).

El método de cultivo más empleado es por lotes o "batch" que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores salvo en lo referente a los gases (aireación, producción de CO<sub>2</sub> y otros), que se suministran y retiran en forma continua Benavides (1995), Stsii et.al. (1991).

La operación por lote alimentado o "fed batch" es una técnica que ha permitido obtener altas concentraciones celulares y cortos tiempos Yee et.al. (1992), Schmitdt et. al. (1994). Son frecuentemente usados para obtener altas concentraciones celulares y mejorar la productividad, lo mismo que para minimizar los problemas de inhibición por sustrato y limitaciones de oxígeno disuelto en cultivos aeróbicos.

El cultivo por lote alimentado (CLA) es una operación durante la cual los nutrientes o parte de ellos son introducidos al fermentador, en forma continua o intermitente, mediante una corriente de alimentación y al no existir una corriente de descarga provoca una continua variación del volumen de fermentación Moll et. al. (1978).

Como criterio de control durante la fermentación, no sólo existe el método de predeterminedar la velocidad del flujo de alimentación, sino también el de fijar la concentración de uno o varios nutrientes en el medio; lo cual puede hacerse incrementando la concentración de la alimentación a un valor mayor de la existente dentro del fermentador y alimentar proporcionalmente para

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, A.A. 35907 Santafé de Bogotá, lcaicedo@ingenieria.ingsala.edu.co

<sup>2</sup> Bavaria S.A.

mantener en el biorreactor una concentración constante. De ésta manera, la levadura se mantiene en la fase de crecimiento logarítmica debido a que el flujo de alimentación del sustrato será siempre igual o mayor a la demanda máxima, y en estas condiciones la masa celular crecerá a la velocidad específica máxima de crecimiento (máx). A esta técnica de operación se le ha denominado cultivos de alta densidad y permite obtener altas concentraciones celulares Schmitd et. al. (1995), Yee et. al. (1992).

**ASPECTOS TEORICOS DE LA PROPAGACION POR LOTES Y LOTE ALIMENTADO**

El crecimiento celular resultante en un biorreactor puede ser analizado considerando el balance de materia para el sustrato y biomasa. La ecuación general de balance para un componente en el fermentador es:

$$\frac{dC}{dt} V + C \frac{dV}{dt} = F C_f - C_r C + \mu C V$$

En un proceso por lotes, los flujos de entrada y salida son cero; luego la ecuación se reduce a:

$$\frac{dC}{dt} V = \mu C V$$

El balance para el sustrato se expresa como:

$$\frac{dS}{dt} V = -\mu C V \frac{S}{Y C}$$

En el proceso por lote alimentado, a diferencia del lote se tiene una corriente que es la de entrada de sustrato. El balance global para un biorreactor de volumen variable será :

$$\frac{dS}{dt} V + S \frac{dV}{dt} = F S_f - C_r S + \mu C V \frac{S}{Y C}$$

El balance para la biomasa será:

$$\frac{dC}{dt} V + C \frac{dV}{dt} = F C_f - C_r C + \mu C V$$

El balance para el sustrato será:

$$\frac{dS}{dt} V + S \frac{dV}{dt} = F S_f - C_r S + \mu C V \frac{S}{Y C}$$

El presente trabajo tiene como objetivo inicial estudiar la propagación de la levadura por lote “batch” y lote alimentado “fed-batch”. Como segundo objetivo determinar, a partir de los resultados del proceso por lotes, el modelo cinético que más se ajuste a los resultados experimentales para simular la propagación por lote alimentado y confrontarlo con los datos experimentales.

**MATERIALES Y METODOS**

**Propagación por lotes**

En el laboratorio se llevaron a cabo dos cinéticas a volumen de siete litros, manteniendo el flujo de aire en 0,26 vvm, a temperatura y agitación constantes.

**Materiales:**

Se utilizó un propagador de vidrio, de 10 litros de capacidad con Mosto cervecero estéril a una concentración inicial que varía entre 10 y 16 grados/plato. Para el análisis de muestras se utilizó una cámara de conteo y el analizador de cerveza para determinar la concentración celular y la de sustrato respectivamente.

**Propagación por lote alimentado**

El material usado para llevar a cabo la propagación es el mismo que el usado en el cultivo por lotes.

Se realizaron cuatro propagaciones en cultivo por lote alimentado, utilizando diferentes técnicas de alimentación; en las dos primeras se empleó el flujo de alimentación puntual, en la tercera se trabaja con un flujo combinado puntual y continuo, y en la última se aplica el concepto de cultivo de alta densidad.

Se considera flujo puntual aquel en el cual se introduce la alimentación en un intervalo de tiempo muy corto (flujo chorro), simulando una función impulso; mientras que el flujo continuo cuando se introduce la alimentación en forma ininterrumpida en un tiempo mucho más largo.

**Primera Técnica: Alimentación de 200 mL.**

En este ensayo se inicia la alimentación a las doce horas de iniciada la propagación y se alimenta al fermentador 200 mL puntuales cada hora y media ó dos horas hasta la hora 25 cuando finaliza la propagación.

**Segunda Técnica: Alimentación de 400mL**

El objetivo de este ensayo es ver si el sistema soporta mayores flujos de suministro y para esto se realiza una simulación de la propagación y de acuerdo con los resultados se decide trabajar con 400mL puntuales. La alimentación se inicia a las 12 horas y la adición se hace cada hora y media ó dos horas hasta la hora 20.

**Tercer Técnica: Alimentación combinada puntual - continua**

Este ensayo inicia la alimentación continua a la hora 9 con flujos de 300mL/hora hasta la hora 14, a la hora 16

se introducen puntualmente 1000mL. No hay alimentación entre la hora 17 y la hora 21, a la hora 22 se inicia nuevamente la alimentación con flujos puntuales de 500 y 1000mL cada hora hasta la hora 28 en que finaliza la propagación.

**Cuarta técnica: Cultivo alta densidad**

Con base en los resultados de la técnica anterior donde se presentaron variaciones altas en la concentración celular, se realiza un nuevo ensayo aplicando el concepto de cultivo de alta densidad con el fin de disminuir el volumen de adición y así disminuir el efecto de dilución.

Se alimentó al biorreactor mosto a una concentración tres veces mayor que la inicial y a un flujo tal que permitió guardar la concentración del mosto; de esta manera se trabaja con menos volumen de agua, adicionando volúmenes pequeños de mosto para así obtener altas concentraciones celulares.

Se inicia la alimentación a la hora 9 con 100 mL y se adicionan 50 mL a la hora 14, 16 y 18; a la hora 22 se para la propagación.

**RESULTADOS Y ANALISIS**

**Propagacion por lotes**

**Modelo Cinético para la propagación y parámetros cinéticos**

Con el fin de ajustar los datos experimentales a un modelo matemático se utilizó el programa "Biokin" Osorio et. al. (1994), que evalúa ocho modelos matemáticos para el crecimiento celular. El Modelo de Monod fue el que mejor se ajusto a los resultados, ya que presenta la menor suma de cuadrados residuales.

En la tabla 1 se muestran los parámetros obtenidos: constante de saturación  $K_s$ , velocidad máxima de crecimiento símbolo  $\mu_{109}$  y  $\mu_{10max}$ , y factor de rendimiento  $Y_{x/s}$ ; para las dos fermentaciones con flujo de aire continuo.

Tabla 1 **Parámetros cinéticos para cultivos por lotes**

Volumen (mL)	$K_s$ (°P)	$\mu_{max}$ ( $hr^{-1}$ )	$Y_{x/s}$ (mill cel/°P)
7	1389	23.60	28.92
7	1539	27.79	29.69

**Simulación de la propagación**

Al tener definido el modelo y los parámetros cinéticos se procede a elaborar un programa de computador denominado "Propakin" que simula la propagación por

lotes. Este programa permite conocer la concentración celular y de sustrato a diferentes intervalos de tiempo durante el proceso.

En las figuras 1,2, se observan las curvas correspondientes a los datos experimentales (círculos) y los datos que arroja el programa de simulación (línea). Como se observa en las gráficas, el modelo es una buena aproximación a los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio.

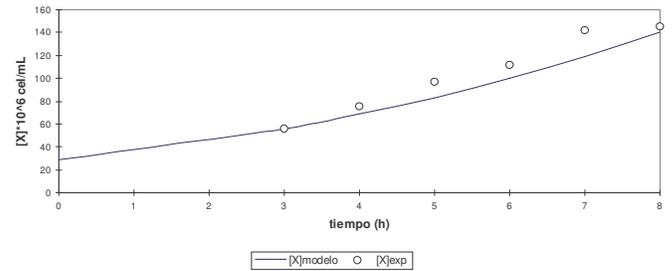


Figura1. **Simulación de la concentración celular**

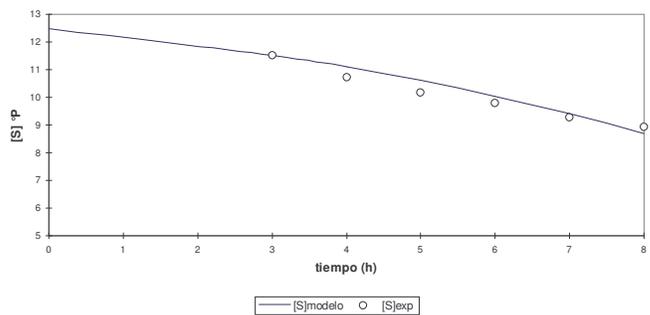


Figura 2. **Simulación de la concentración de para la cinética a  $v=7L$ . sustrato para la cinética a  $v=7L$ .**

**Lote alimentado**

**Primera Técnica :**

Los resultados de la propagación pueden observarse en las siguientes figuras:

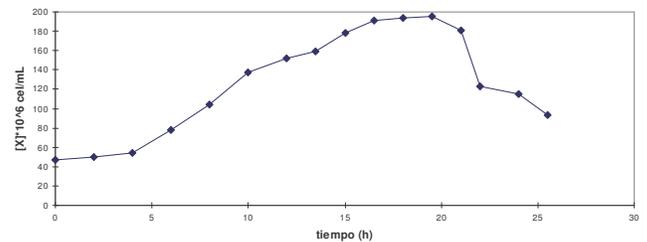


Figura 3. **Variación de la concentración celular.**

Como se aprecia en la figura 3 se alcanza una concentración celular máxima de  $2 \times 10^8$  células/mL a las 19 horas logrando un buen crecimiento celular. En la figura 4 la velocidad de consumo de sustrato es mayor en las primeras 12 horas; y a la hora 16 cuando se tiene una concentración de 7,4 grados plato se inicia la formación

de alcohol, la cual aumenta a medida que el sustrato disminuye.

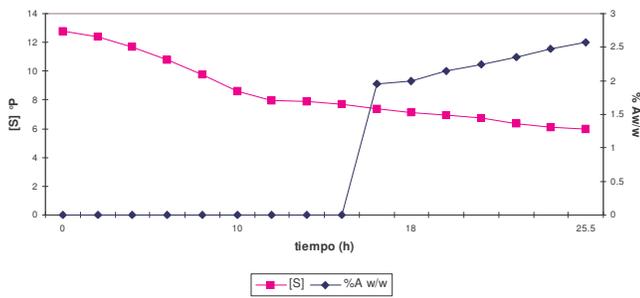


Figura 4. Variación del consumo de sustrato y formación de alcohol.

**Segunda Técnica : Alimentación de 400 mL**

Se obtiene una concentración máxima de  $1.5 \times 10^8$  células/mL a las 13.5 horas, el proceso se estabiliza manteniendo esta concentración hasta la hora 18. La concentración de sustrato se mantiene entre 7 y 8 grados plato durante la alimentación pero sin embargo hay formación de alcohol.

Los resultados se observan en las figuras 5,6.

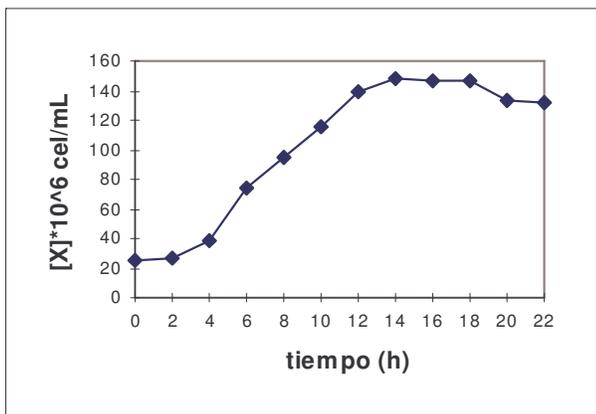


Figura 5. Variación de la concentración celular

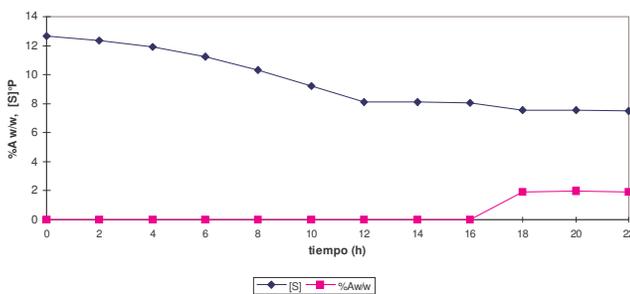


Figura 6. Variación del sustrato y formación de alcohol.

Las figuras 7 y 8 presentan los resultados experimentales y los obtenidos mediante simulación del modelo empleando el programa "Propakin" Caicedo(1996).

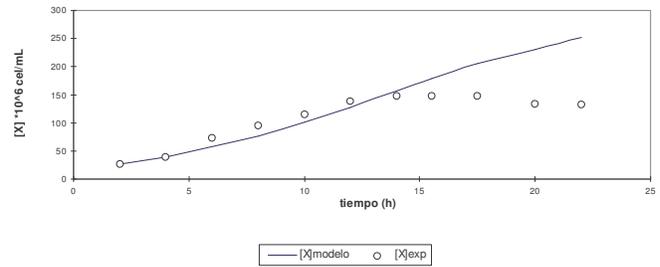


Figura 7. Simulación de la concentración celular

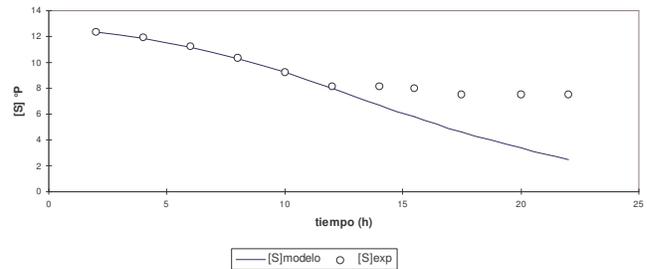


Figura 8. Simulación del consumo de sustrato

Como puede observarse en las figuras anteriores el modelo arroja datos muy aproximados a los resultados experimentales hasta la hora 14, que corresponden a la fase de cultivo por lote, de ahí en adelante el modelo predice que el cultivo sigue en fase log. Pero los resultados experimentales se alejan del modelo por cuanto la concentración celular y de sustrato experimental se mantienen mas o menos constantes y el modelo predice un incremento. Se puede inferir un posible cambio de los parámetros cinéticos por acción de la adición de sustrato.

**Tercera Técnica : Alimentación combinada puntual-continua**

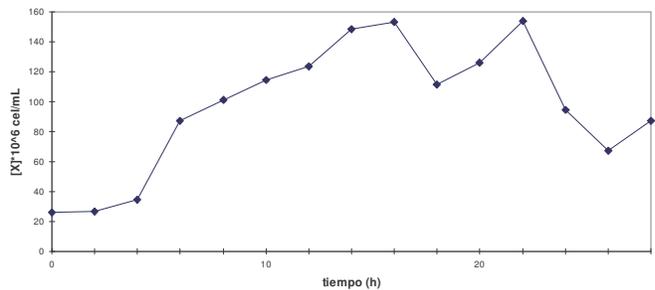


Figura 9. Variación de la concentración celular

Los resultados experimentales de la concentración celular y de sustrato se muestran en las figuras 9, 10. En la figura 9 se presentan dos fases log; la primera con un tiempo de duración de 16 horas, y una concentración celular máxima de  $1.5 \times 10^8$  células/mL; y la segunda con 6 horas de duración y  $1.5 \times 10^8$  células/mL. También puede observarse una caída brusca en la concentración celular que se presenta durante la adición puntual.

En la figura 10 puede apreciarse que de la hora 9, momento en que se inicia la alimentación, hasta la hora 24 los grados plato se mantienen entre 8 y 9, y vuelven a

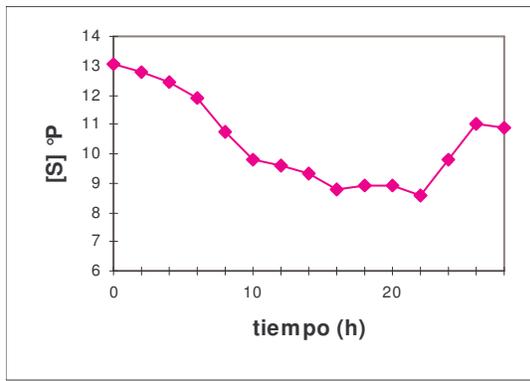


Figura 10. **Variación del consumo de sustrato** subir cuando se reanuda el suministro de mosto.

En las figuras siguientes se presentan los resultados experimentales y los resultados obtenidos modelando.

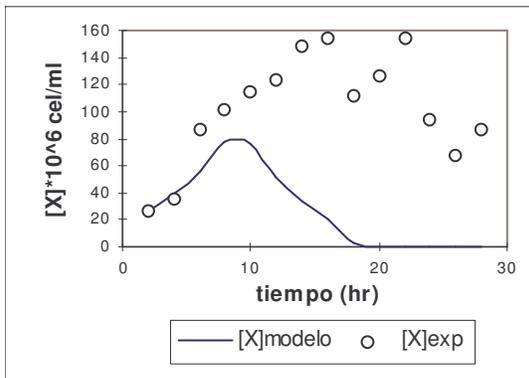


Figura 11. **Simulación de la concentración celular**

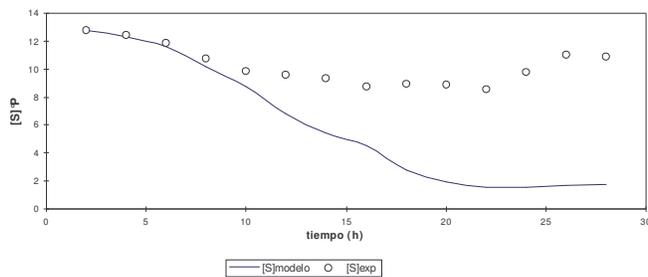


Figura 12. **Simulación del consumo de sustrato**

Como puede observarse en la figura 11 el modelo predice una fase log corta donde la concentración celular llega hasta 80 millones por efecto de las diluciones; mientras que los resultados experimentales muestran dos fases log, como también dos caídas en la concentración.

En la figura 12 se aprecia que el consumo de sustrato desciende abruptamente, lo que indica que el modelo no predice el periodo de recuperación o de estabilidad.

Los anteriores resultados indican que el modelo predice la fase de cultivo por lotes pero no la de adición continua, donde se producen grandes cambios en el

comportamiento celular que el modelo no contempla. Estos cambios favorecen el crecimiento celular y disminuyen el consumo de sustrato, luego deben afectar la velocidad específica y el factor estequiométrico  $Y_{x/s}$

**Cuarta Técnica : Cultivo de alta densidad**

Realizado con el fin de aumentar la productividad disminuyendo el volumen total y aumentando la concentración celular, se basó en los resultados de la simulación donde se empleó la adición puntual por facilidad de operación.

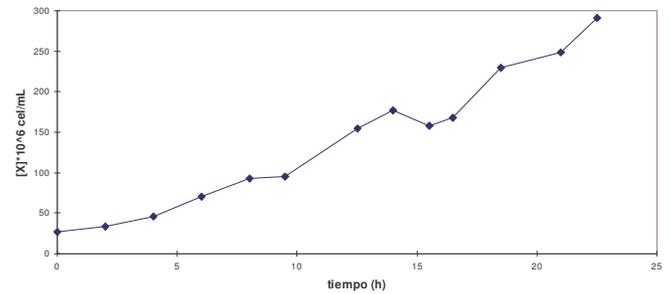


Figura 13. **Variación de la concentración celular**

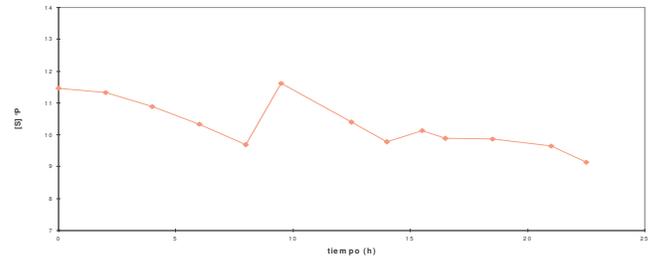


Figura 14. **Variación del consumo de sustrato**

Como puede observarse en la figura 13 la concentración se mantiene en fase log hasta la hora 14, en este momento disminuye muy poco por efecto de dilución pero se mantiene en fase de crecimiento alcanzando una concentración máxima de  $2.9 \times 10^8$  células/mL.

En la figura 14 puede apreciarse que en la hora 9 se presenta un pico por causa de una adición alta, después se estabiliza manteniéndose entre 9 y 10.5 grados plato.

En las figuras 15 y 16 se observan los resultados de la simulación:

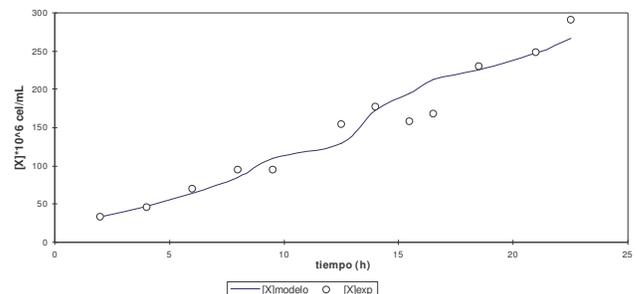


Figura 15. **Simulación de la concentración celular**

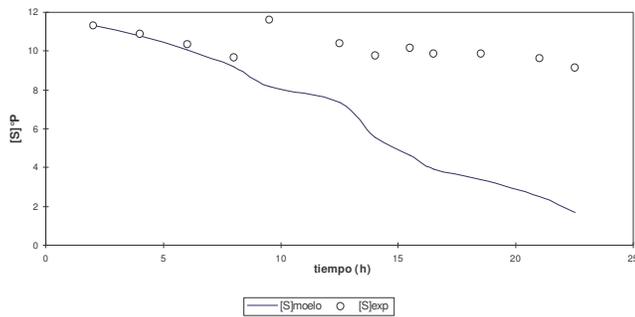


Figura 16. Simulación del consumo de sustrato

Como se aprecia en la figura 15 los resultados experimentales se aproximan muy bien a los que predice el modelo en cuanto al crecimiento celular. En la figura 16 el modelo predice un consumo continuo de sustrato; mientras que los resultados experimentales muestran que la concentración se mantiene entre 9 y 11 grados plato, esto puede indicar variación del factor estequiométrico  $Y_{x/s}$  en ésta fase de la propagación.

#### Factor de propagación:

El factor de propagación (F.P) se determina como el cociente de las células cosechadas y la cantidad de células transferidas como inóculo Smith et. al. (1994):

$$F.P = \frac{\text{Células Máximas}}{\text{Células Inóculas}}$$

En la figura 18 puede observarse el factor de propagación para los cuatro sistemas de propagación; obteniéndose el mayor valor en la técnica de alta densidad resultado de emplear la cantidad adecuada de inóculo y el método apropiado de alimentación.

#### CONCLUSIONES

La adición de sustrato produce cambios en las características de la célula que se ven reflejados en las variaciones de los parámetros cinéticos determinados a partir de un cultivo por lotes.

Los flujos altos en la alimentación continua-puntual provocan mayores fluctuaciones en la concentración

celular durante la propagación debido probablemente a cambios en el comportamiento de la célula y en menor proporción a los efectos de dilución que se presenta en el periodo de alimentación.

Trabajando la propagación en cultivo de alta densidad se evitan drásticas variaciones en la concentración celular y se obtiene una mayor productividad.

De acuerdo con "Propakin" se establece que es posible simular el comportamiento de la propagación de la levadura durante la fase por lote y que el tipo de alimentación afecta de diferente forma el comportamiento de las células.

El factor de propagación puede ser usado como parámetro de control en el proceso de propagación.

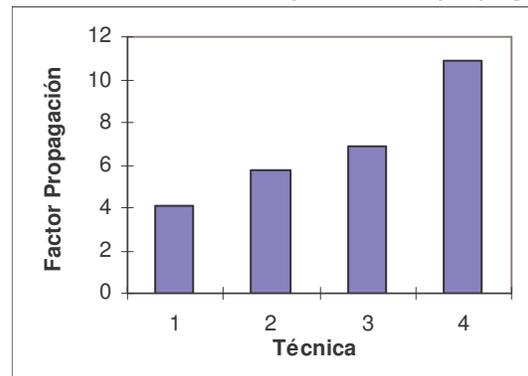


Figura 18. Factor de Propagación vs Técnicas

#### AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional.

A la empresa Bavaria S.A, donde se realizó la parte experimental de este estudio.

#### Nomenclatura

max : velocidad máxima de crecimiento celular.

$Y_{x/s}$  : factor de rendimiento ó de conversión de sustrato en células.

$K_s$  : constante de saturación.

#### BIBLIOGRAFIA

- Benavides H.** 1995. "Propagación de la levadura cervecera y mantenimiento de las cepas, con el sistema de Liofilización". Asociación de Maestros Cerveceros de las Américas, No 2, 130-149.
- Curso Internacional de Fermentaciones.** 1995. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional.
- Caicedo L.** "Programa de Simulación - Propakin", Universidad Nacional, (por registrar).
- Knudsen F.B.** 1985. A.S.B.Ch. "Aplicación del Método del Cultivo Continuo en la Propagación de Levaduras" 43, (2), 91-95.
- Knudsen F.B.** 1987. "Fermentación". El Cerveceros en la Práctica. Segunda edición.
- Moll M., Duteutre B., Scion G. & Mlehuede J.** 1978. "The Growth of the Yeast"

MBAA Technical. Quarterly, 15, (1), 26-29.

**Osorio R., Rivera R., Caicedo L., Penal.** "Programa Biokin", Universidad Nacional.

**Schmidt H.J., Grafelfing.** 1994. "Accelerate Test Propagation" Brawelt International, 11, No 2, 55-62.

**Schmidt H.J., Grafelfing.** 1995. "Accelerated Propagation of Pure Culture Yeast". Brawelt International. 13, No 2, 130-149.

**Stssi P., Goetki G., P., & Fehring J.** 1991. "Method for Propagation of Yeast Brewing" MBAA, 28, 84-88.

**Uirik J., Piper.** 1978. "Propagation of Pitching Yeast" MBAA Technical Quarterly, No 1.

**Yee. and H.W Blanch.** 1992. "Recombinant Protein Expression in High Cell Density Fed- Batch Cultures of Escherichi coli". Biotechnology, 10,83-89.