

Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE CIÈNCIES

DEPARTAMENT DE QUÍMICA

UNITAT D'ENGINYERIA QUÍMICA

**DEFINICION DE ESTRATEGIAS DE OPERACION EN PROCESOS  
BIOTECNOLOGICOS MEDIANTE EL USO DE TECNICAS DE  
MONITORIZACION Y CONTROL: APLICANCION A LA PRODUCCION  
DE LIPASAS POR *Candida rugosa***

Programa de doctorat:

**BIOTECNOLOGIA BIOQUIMICA I  
DE DESENVOLUPAMENT DE PROCESSOS**

Treball experimental presentat per:

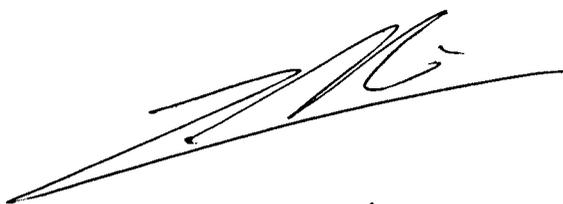
**JOSE LUIS MONTESINOS SEGUI**

BELLATERRA, DESEMBRE 1993

CARLES SOLA I FERRANDO, CATEDRATIC I JAVIER LAFUENTE SANCHO,  
PROFESSOR TITULAR DE LA UNITAT D'ENGINYERIA QUIMICA, DEL DEPARTAMENT  
DE QUIMICA DE LA UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA.

CERTIFIQUEM: Que el llicenciat José Luis Montesinos Seguí ha dut a terme amb la nostra direcció, en els laboratoris de la Unitat d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol de : "Definición de estrategias de operación en procesos biotecnológicos mediante el uso de técnicas de monitorización y modelización: Aplicación a la producción de lipasas por *Candida rugosa*" es presenta en aquesta memoria, la qual constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctor en Ciències, Secció de Químiques.

I per a que en prenguin coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem i apadrinem davant la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant aquesta certificació a Bellaterra, 8 de Novembre de 1.993.



CARLES SOLA I FERRANDO



JAVIER LAFUENTE SANCHO

# INDICE

0.- RESUMEN . . . . .	
1.- INTRODUCCION . . . . .	
1.1 Lipasas . . . . .	
1.1.1. Estructura y función. . . . .	
1.1.2. Especificidad. . . . .	
1.1.3. Análisis de lipasas. . . . .	
1.1.4. Aplicación de los enzimas lipolíticos. . . . .	
1.1.5. Producción. Microorganismos productores. . . . .	
1.2. Encuadre del trabajo dentro del Proyecto CICYT-CIRIT QFN914207. . . . .	
1.3. Regulación de la síntesis enzimática. . . . .	
Bases bioquímicas de la producción de lipasas. . . . .	
1.4. Metodología de la modelización. . . . .	
1.4.1. Estructura matemática. . . . .	
1.4.2. Métodos de optimización. . . . .	
1.4.3. Calibración y validación del modelo. . . . .	
1.5. Modelos de cinética microbiana. Tipos de modelos. . . . .	
1.6. Aplicaciones de la modelización. Control de biorreactores. . . . .	
1.7. Instrumentación y medida en procesos biotecnológicos. . . . .	
1.7.1. Instrumentación. . . . .	
1.7.2. Procesamiento de señal. . . . .	
2.- OBJETIVOS . . . . .	
3.- MATERIALES Y METODOS . . . . .	
3.1. Instalación experimental de fermentación. . . . .	
3.2. Reactivos. . . . .	
3.3. Técnicas microbiológicas. . . . .	
3.3.1. Mantenimiento de la levadura. . . . .	
3.3.2. Preparación del inóculo. . . . .	
3.3.3. Preparación de las muestras. . . . .	



3.3.4.	Evaluación de la biomasa. . . . .	.....
3.3.5.	Tinción al microscopio y observaciones. . . . .	.....
3.4.	Métodos analíticos. . . . .	.....
3.4.1.	Determinación de la composición elemental del microorganismo. . . . .	.....
3.4.2.	Test de actividad enzimática (lipásica). . . . .	.....
	<i>Método de valoración.</i> . . . . .	.....
	<i>Método turbidimétrico.</i> . . . . .	.....
3.4.3.	Determinación de la actividad lipásica extracelular. . . . .	.....
3.4.4.	Determinación de la actividad lipásica intracelular. . . . .	.....
3.4.5.	Análisis de proteasas. . . . .	.....
3.4.6.	Determinación de la proteína extracelular. . . . .	.....
3.4.7.	Determinación de la proteína intracelular. . . . .	.....
3.4.8.	Análisis de fuente de nitrógeno. . . . .	.....
	<i>Urea</i> . . . . .	.....
	<i>Nitrógeno amoniacal N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i> . . . . .	.....
3.4.9.	Fosfato inorgánico. . . . .	.....
3.4.10.	Acidos grasos. Acido Oleico. . . . .	.....
3.5.	Preparación y operación de la fermentación.	.....
	Complicaciones experimentales. . . . .	.....

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .

4.1.	Resumen de resultados previos. Antecedentes experimentales. . . . .	.....
4.2.	Experimentos de fermentación. . . . .	.....
4.2.1.	Estudio de diferentes fuentes de Carbono, Acidos grasos. . . . .	.....
4.2.2.	Fermentación en continuo I. . . . .	.....
	Influencia de la fuente de nitrógeno. . . . .	.....
4.2.3.	Fermentaciones en semi-continuo. . . . .	.....
4.2.4.	Fermentaciones en discontinuo. Utilización de una nueva fuente de nitrógeno. Influencia de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno. . . . .	.....
4.2.5.	Fermentación en continuo II. . . . .	.....
	<i>Efecto de la frecuencia de adición del substrato.</i> . . . . .	.....
	<i>Influencia de la velocidad de dilución.</i> . . . . .	.....
4.3.	Medida y estimación. . . . .	.....
4.3.1.	Instrumentación. . . . .	.....
4.3.2.	Utilización de la espectrometría de masas. . . . .	.....
	<i>Análisis de gases. Determinación Cer, Our y RQ.</i> . . . . .	.....
	<i>Tratamiento de señales.</i> . . . . .	.....
4.3.3.	Estimación de variables de estado y parámetros. . . . .	.....
	<i>Bases matemáticas.</i> . . . . .	.....
	<i>Estimación de variables de estado.</i> . . . . .	.....

*Estimación conjunta de variables de estado y parámetros. . . . .*

4.4. Modelización. . . . .

4.4.1. ACSL. Lenguaje de simulación. Herramienta de modelización. . .

4.4.2. Consideraciones cualitativas. Observaciones y estudios realizados.

4.4.3. Formulación matemática. . . . .

4.4.4. Calibración del modelo. . . . .

5.- CONCLUSIONES . . . . .

6.- NOMENCLATURA . . . . .

7.- BIBLIOGRAFIA . . . . .

8.- APENDICE . . . . .

## **0.- RESUMEN**

## 0. RESUMEN

En el presente trabajo la selección del medio de cultivo y modo de operación adecuado han permitido mejorar en 20 veces el rendimiento original de enzima obtenido. Esta mejora ha sido posible utilizando métodos ingenieriles. Los métodos han sido principalmente la definición o selección de estrategias de operación utilizando técnicas como la monitorización, estimación y modelización del proceso con técnicas avanzadas.

Se han hecho estudios sobre los mejores inductores posibles de la producción de lipasas por *Candida rugosa*. Para conocer si el enzima es inducido por el ácido oleico o por otro metabolito, se han probado diferentes ácidos grasos de cadena corta, concluyendo que desde el punto de vista de aplicación industrial el ácido oleico, podría ser considerado como el mejor sustrato investigado.

El efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de lipasas ha sido investigado. Si bien en cultivo en discontinuo, tan sólo se han observado pequeñas diferencias, en cultivo en continuo ha sido decisivo la utilización de una fuente de nitrógeno alternativa a la urea, tal como el sulfato amónico, ya que ha conseguido solucionar los problemas operativos observados en trabajos anteriores.

Por otro lado, se ha puesto a punto las herramientas necesarias y el entorno para un sistema inteligente capaz de realizar en un proceso de fermentación y a tiempo real el procesamiento de datos, actuar en todos los elementos del proceso, estimar parámetros para variables no medibles directamente, solventando la falta de información de parámetros clave para propósitos de control, el uso de conocimiento heurístico del proceso, y aplicar estrategias de control avanzado. Ello permite la posibilidad de mejora de la productividad en la producción de lipasas, hasta niveles competitivos, para llevar a cabo la implementación a nivel industrial.

Se ha desarrollado un modelo matemático, de carácter dinámico que aglutina y organiza toda la información del sistema. Este modelo es útil para la simulación del proceso, su control y, eventualmente, el cambio de escala, así como en la definición de las estrategias de operación más adecuadas.

## **1.- INTRODUCCION**



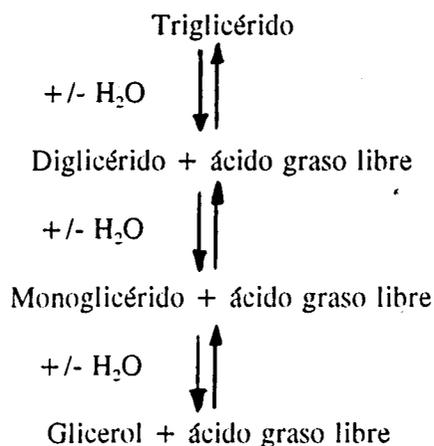
# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Lipasas

Los enzimas son biocatalizadores que permiten que las reacciones químicas tengan lugar en los seres vivos a temperatura ambiente. La misma reacción realizada en una planta química clásica requiere sistemas de reactores complejos y condiciones de trabajo extremas.

El término lipasa (glicerol ester hidrolasa ó acilglicerol acilhidrolasa EC. 3.1.1.3) comprende un grupo de enzimas hidrolíticos de amplia y extendida presencia en el reino animal y vegetal, producidos por plantas, animales y microorganismos. Si bien los primeros estudios se realizaron con enzimas que participaban en el metabolismo lípidico en animales, siendo la lipasa pancreática la más utilizada, recientemente ha aumentado el estudio sobre las lipasas de diferente origen: hongos, levaduras y bacterias.

Su función biológica es primordialmente catalizar la hidrólisis de triglicéridos (triacilglicerol) para dar ácidos grasos libres, mono y diglicéridos (mono y diacilglicerol) y glicerol (Figura 1.1).



*Figura 1.1. Mecanismo de acción de las lipasas.*

Esta reacción es reversible, ya que la lipasa también cataliza la formación de triglicéridos a partir de glicerol y ácidos grasos. La variación de la concentración de agua en el medio es el factor comúnmente empleados para dirigir la reacción hacia la hidrólisis o la síntesis.

Aunque las lipasas han sido estudiadas durante años y pueden ser producidas a gran escala mediante el crecimiento de microorganismos en fermentadores, sus aplicaciones industriales son escasas en comparación con otros enzimas hidrolíticos como las proteasas o las carbohidrasas.

Los enzimas lipolíticos han empezado a ser utilizados en la industria química relativamente reciente en comparación con la utilización de otros tipos de enzimas en la industria farmacéutica, alimentaria y de limpieza. No obstante en la última década ha crecido continuamente su interés en el campo de la biotecnología de aceites y grasas. Su tardía aparición se debe a que en un pasado reciente el estudio de los biocatalizadores y su uso se restringió a sistemas totalmente acuosos.

El aumento del uso de productos químicos y bioquímicos altamente específicos ha sido la fuerza impulsora del desarrollo de la Biotecnología en sistemas multifásicos, con baja o nula solubilidad en agua y que no pueden ser sintetizados por vía química normal. Este hecho ha provocado el inicio de un estudio a fondo sobre la producción, propiedades y aplicación de enzimas en medios parcial o totalmente orgánicos. El desconocimiento bioquímico de estos enzimas es la principal causa de su poca aplicación industrial en comparación con otros enzimas como las proteasas.

### **1.1.1. Estructura y función**

De la purificación de lipasas provenientes de diferentes fuentes se han realizado estudios de algunas de sus propiedades (Brockerhoff y col. 1974, Macrae 1983) obteniéndose, en general, que las lipasas son glicoproteínas ácidas con un peso molecular comprendido entre 20 y 60 kd. Su actividad específica como proteína pura varía entre 1000 y 10000 unidades por miligramo de proteína, definiendo como unidad de actividad, la que logra producir un micromol de ácido graso por minuto a partir de un triglicérido bajo las condiciones del ensayo enzimático.

La mayoría de las lipasas purificadas contienen entre un 2% y un 15% de carbohidratos; el mayor residuo glucósido presente en todos los casos ha sido la manosa, y en cantidades más pequeñas la galactosa, xilosa y arabinosa. La parte carbohidratada de la cadena proteínica (lipasa) probablemente no se encuentra asociada a la actividad catalítica del enzima, siendo, al parecer, su

función la protección del enzima contra la hidrólisis por proteasas extracelulares. Por ejemplo la autólisis de la lipasa de *Rhizopus arrhizus* (Semeriva y col. 1969) da un peso molecular menor en glicopéptidos y en carbohidratos libres con una gran actividad enzimática.

Se conoce la composición de aminoácidos de un gran número de lipasas (Brockerhoff y col. 1974, Macrae 1983). Algunas investigaciones sugieren que las lipasas contienen una excepcionalmente alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos y que esta característica es la responsable de su interacción con substratos hidrofóbicos. Sin embargo, estudios de la composición de aminoácidos que publicados muestran claramente que, como grupo, las lipasas no serían más hidrofóbicas que otros grupos de enzimas (Semeriva y col 1969).

Cristales de lipasa de *Geotrichum candidum* han sido analizados mediante rayos X hasta una resolución de 2,8 Å. La molécula es elipsoidal con dimensiones de 50x50x70 Å (Borgström 1984). Cerca de su centro molecular se encuentra un gran espacio, dentro del cual se supone que se encuentra el centro activo ya que es suficientemente grande como para admitir una molécula de trioleína.

La lipasa cristalina contiene nueve hélices alfa y cuatro hebras beta. Los residuos esenciales para la actividad del enzima dependen de la especie estudiada (Borgström 1984). Estudios realizados con *Candida cylindracea* (Kawaguchi y col 1989) y *Geotrichum candidum* demuestran que sus lipasas tienen el triplete catalítico Ser-His-Glu, con Glu reemplazando el usual Asp encontrado en otras lipasas y serina proteasas (Schrag y col. 1991, Winkler y col. 1990)

Debido a que las lipasas no contienen una elevada proporción de residuos hidrofóbicos, su fuerte tendencia a adsorberse sobre superficies hidrofóbicas puede deberse a que los aminoácidos hidrofóbicos estén agrupados en unas determinadas zonas de la superficie de la proteína, hecho que además justificaría la agregación de las moléculas de lipasas. Esta suposición queda confirmada en la lipasa pancreática de cerdo, cuya estructura primaria (De Caro y col. 1981) tiene una secuencia que contiene dos segmentos especialmente ricos en aminoácidos hidrofóbicos, siendo estas regiones las que pueden estar asociadas al reconocimiento y unión con el substrato.

Se ha observado (Borgström 1984) que las lipasas tienen como característica diferencial, con otros grupos de enzimas, un valor más elevado de la superficie activa que en el resto de enzimas. Que

las lipasas tengan un valor elevado en la superficie activa, puede explicar que una proteína soluble en fase acuosa sea capaz de catalizar la hidrólisis de un sustrato insoluble, debido a su capacidad de adsorción sobre superficies hidrofóbicas.

Las lipasas son, generalmente, estables en soluciones acuosas neutras a temperatura ambiente. Muchas lipasas microbianas extracelulares, así como la lipasa pancreática, pierden actividad si se almacenan por encima de los 40°C. Algunas como las producidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus* y *Chromobacterium viscosum* son estables en solución por encima de los 50°C. La proveniente del hongo termotolerante *Humtcula lanuginosa* es estable a 60°C. Una cepa de *Pseudomonas nitroreducans* produce lipasas a 70°C, y el enzima proveniente de *Pseudomonas fluorescens* es sólo parcialmente inactivado a altas temperaturas, pudiendo ser el responsable de la descomposición de productos lácticos tratados por calor. Las lipasas que presentan una estabilidad térmica al calor podrían ser particularmente útiles en algunas aplicaciones industriales.

En general, las lipasas presentan una amplia zona de pH en que se mantiene su actividad lipolítica. Un rango óptimo común oscila entre pH 6 y 8. No obstante, las lipasas provenientes de *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, y *Rhizopus arrhizus* son particularmente activas a pH bajo, mientras que las lipasas provenientes de *Pseudomonas nitroreducans* son activas en la zona alcalina pH=11.

No es imprescindible la presencia de cofactores para la actuación de las lipasas, aunque aquellas sustancias que afecten la cantidad o propiedades de la interfase entre el sustrato y la solución acuosa tienen efecto sobre la velocidad de reacción. Por ejemplo, concentraciones altas de surfactantes pueden inhibir la reacción porque evitan el acceso del enzima a su sustrato. No hay evidencia de la producción de colipasas por parte de microorganismos como ocurre en las producidas por el cuerpo humano.

Las sales pueden tener un pronunciado efecto sobre la reacción de la lipasa al actuar sobre la ionización de los ácidos grasos. En particular, los iones calcio estimulan la acción lipolítica al precipitar, como jabones cálcicos, los aniones de ácidos grasos que se comportan como inhibidores.

**1.1.2. Especificidad**

Esta es una característica interesante de las lipasas, que nos permite agruparlas en dos grandes grupos:

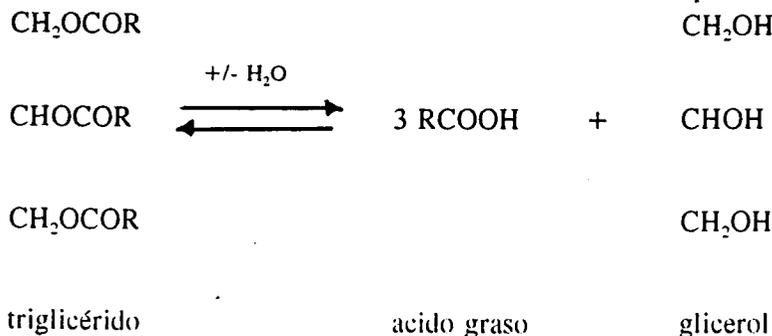
(a) **lipasas no específicas.**

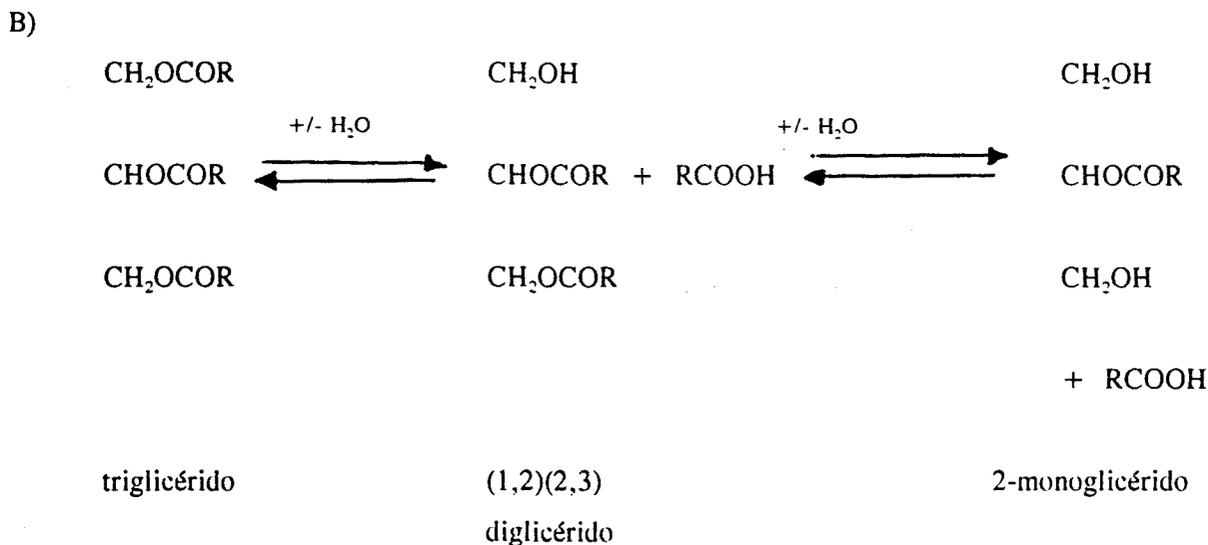
(b) **lipasas específicas.** Dentro de estas existen dos subtipos; con especificidad posicional y con especificidad hacia el ácido graso.

\* **lipasas no específicas.** Estas hidrolizan el triglicérido para obtener los ácidos grasos de cualquiera de las tres posiciones posibles del glicerol, apareciendo como productos intermedios los (1,2)(2,3)(1,3)-diglicéridos y los monoglicéridos. *Candida rugosa* y *Candida curvata* (Rose y col. 1989) poseen lipasas de este tipo.

\* **lipasas específicas.** el grupo con especificidad posicional hidrolizan solamente las posiciones n-1,3 de los triacilglicerol, siendo los productos intermedios (1,2)(2,3)-diglicéridos y el 2-monoglicérido. La velocidad de hidrólisis de los triglicéridos es, generalmente, más rápida que la de los di y monoglicéridos, que se acumulan durante la reacción. Debido a que los (1,2)(2,3) diglicéridos y el 2 monoglicérido son químicamente inestables, sufren migraciones del grupo acil para obtener 1-3 diglicérido y 1-monoglicérido. Una incubación prolongada de un aceite con estas enzimas proporcionará la ruptura completa de alguno de los glicéridos con la consiguiente formación de glicerol (Figura 1.2).

A)





**Figura 1.2.** Especificidad de las lipasas. (A) Reacción catalizada por lipasas no específicas. (B) Reacción catalizada por lipasas específicas.

La especificidad posicional de estos enzimas es absoluta y probablemente se deba a algún impedimento estérico de los alcoholes secundarios, en posición 2 del glicerol, para entrar al centro activo de la lipasa. *Yarrowia lipolytica* (*Candida paralipolytica* o *Saccharomycopsis lipolytica*), *Candida deformans*, *Rhodotorula (pilimoniae) rubra*, *Aspergillus niger*, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. delemar* son algunas especies que producen este tipo de lipasas. (Macrae 1983, Macrae y col 1985, Rose y col. 1989).

En la tabla 1.1 se puede observar una clasificación de microorganismos productores de lipasas por su especificidad posicional.

Lipasas no específicas	Lipasas específicas
<i>Candida rugosa</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Mucor javanicus</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>
<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Rhizopus japonicus</i>
<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Rhizopus delemar</i>

**Taula 1.1.** Clasificación de microorganismos productores de lipasas según su especificidad posicional.

El grupo con especificidad hacia los ácidos grasos cataliza la liberación de unos ácidos grasos particulares de los triglicéridos. Ejemplos de este tipo serían la lipasa de *Penicillium cyclopium* que es más activa en triglicéridos de cadena corta, y lipasas de *Aspergillus niger* y *Rhizopus delemar* que actúan liberando ácidos grasos de cadena larga (Borgström y col. 1984). Se ha observado también que la lipasa de *Geotrichum candidum* es muy específica para sustratos insaturados con doble enlace en posición 9 (Sidebottom y col. 1991)

La especificidad de las lipasas respecto al sustrato es una característica crítica para su aplicación en procesos industriales o usos analíticos. Los enzimas pueden mostrar especificidad con respecto a cualquiera de los dos productos resultantes de la hidrólisis, alcohol o ácidos grasos.

En la determinación de la especificidad de las lipasas por los ácidos grasos se debe tener mucho cuidado con los sustratos y las condiciones usadas, con objeto de asegurar que los cambios en las velocidades de reacción relativas se deben a las alteraciones de los grupos acilos/alcoholes y no a otros efectos (Jensen y col. 1983).

Un problema adicional es que algunos de estos sustratos son sólidos (triglicéridos saturados de cadena larga), siendo hidrolizados lentamente por las lipasas (Brockerhoff y col. 1974, Sugiura y col. 1975). Los alquil ésteres de ácidos grasos son sustratos útiles para la investigación de la especificidad de ácidos grasos, debido a que son líquidos a la temperatura normal del ensayo.

Estudios realizados con lipasas de diferentes fuentes (Benzonana y col. 1971, Ota y col. 1972, Liu y col. 1973, Sugiura y col. 1975b, Iwai y col. 1975, Aisaka y col. 1980, Vadehra 1974) demuestran que éstas presentan una especificidad baja cuando se incuban con la mayoría de aceites y grasas naturales excepto al utilizar aceites de pescado y grasa de leche. Las lipasas atacan muy suavemente a la larga cadena de ácidos grasos insaturados presentes en el aceite de pescado y en particular si algún doble enlace se encuentra próximo al grupo carboxil de estos ácidos. La causa probable por la que estos ésteres resisten el ataque de las lipasas es de tipo estérico. Por consiguiente los ésteres de ácidos grasos que contienen un doble enlace o un sustituyente grande cercano al grupo carboxilo son sustratos no deseables para estas enzimas.

En general estas enzimas no hidrolizan el ácido butírico y otros ácidos de cadena corta presentes en la grasa de la leche. No obstante la lipasa del *Mucor miehei* (Moskowitz y col. 1977) sí que ataca a estos ácidos, especialmente a pH bajos.

Muchos microorganismos pueden producir dos o más lipasas extracelulares con diferente especificidad hacia los ácidos grasos, especialmente con respecto a los ácidos grasos de cadena corta. Incluso se han aislado dos tipos de lipasas diferentes producidas por el mismo microorganismo (Sugiura y col. 1975b) con diferentes propiedades en cuanto a la especificidad del sustrato. Por un lado una proteína de bajo peso molecular que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de cadena larga y media pero que no presentan actividad con la tributirina. Mientras que la otra proteína de alto peso molecular cataliza la hidrólisis de la tributirina.

La única lipasa que ha mostrado tener una especificidad muy pronunciada por la hidrólisis de ésteres de un tipo particular de ácido graso de cadena larga es la producida por el hongo *Geotrichum candidum* (Macrae 1983, Jensen y col. 1974, Jensen y col. 1976). Esta lipasa cataliza la hidrólisis de ésteres de ácidos insaturados con un doble enlace cis en la posición 9. La velocidad de hidrólisis es sensiblemente mayor a la hidrólisis de su isómero en la posición trans. La presencia de un doble enlace adicional entre el grupo carboxilo y el doble enlace en la posición 9 hace que los ésteres de ácidos grasos insaturados resistan a la hidrólisis de la lipasa en general. La especificidad del enzima es tal que cataliza preferencialmente el enlace con el ácido oleico, palmitoleico, linoleico y  $\alpha$ -linoleico de aceites y grasas naturales frente a los glicéridos enriquecidos en ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados con un doble enlace pero no en la posición 9.

También se ha comprobado (Okumura y col. 1980) que la lipasa extracelular producida por el *Penicillium cyclopium* hidroliza más rápidamente la monooleína que la trioleína. La combinación de esta lipasa de glicérido parcial con una lipasa convencional proporcionará una mayor rapidez a la hidrólisis de los triglicéridos.

Como conclusión se puede afirmar que los triglicéridos son los sustratos naturales de las lipasas, aunque también catalizarán la hidrólisis de un amplio rango de otros tipos de ésteres con una velocidad de reacción sensiblemente inferior.

### **1.1.3. Análisis de lipasas**

Los niveles de producción de lipasas en los trabajos publicados no son comparables debido a que no hay un único método de análisis establecido. Incluso preparaciones del mismo microorganismo, pero, procedentes de diferentes fuentes o fermentaciones, presentan actividades y condiciones de ensayo óptimas diferentes (Vorderwülbecke y col. 1992).

La definición de unidad de actividad lipolítica también puede variar de unos autores a otros. La IUPAC la define como los micromoles de ácidos grasos liberados por minuto en relación al volumen total de la mezcla de reacción. Algunos de los métodos empleados para la determinación de lipasas son: utilización de sustratos cromogénicos (Miles y col. 1992), métodos de inmunoensayo (Charton y col. 1992), valoraciones de ácidos grasos formados (Valero y col., 1988) y métodos turbidimétricos (Valero y col. 1991b).

El método de valoración de ácidos grasos es una de las técnicas más empleadas. Consiste en realizar una valoración automática a medida que avanza la reacción de hidrólisis, manteniendo el pH de la reacción constante mediante la adición de hidróxido sódico con una bureta automática, o bien, una valoración final fijando el tiempo de reacción.

Los métodos turbidimétricos se basan en la medida de la pérdida de turbidez de una emulsión que contiene un triglicérido, debido a su degradación y a la formación resultante de las sales del ácido graso a medida que aparece en el medio.

### **1.1.4. Utilización y aplicación de enzimas lipolíticas.**

La aplicación industrial de los enzimas en general y de los lipolíticos en particular viene motivada por tres importantes ventajas que presentan los procesos enzimáticos en comparación con los procesos químicos convencionales.

Los enzimas trabajan para modificar enlaces químicos específicos en contraste con las reacciones químicas ordinarias que ocurren aleatoriamente en respuesta a leyes termodinámicas, Obteniéndose una reducción drástica de las reacciones secundarias.

Las condiciones de operación (Temperatura, presión) sufren, en general, una disminución muy importante. Se pasa de altas condiciones de temperatura y presión, necesarias en la industria química convencional para conseguir una velocidad de reacción aceptable, a condiciones de operación suaves sin que la velocidad de la reacción disminuya de una manera importante. Por consiguiente la utilización de catalizadores enzimáticos genera un menor coste de capital, equipos más baratos y de energía.

Los procesos enzimáticos industriales presentan un menor costo en el tratamiento de residuos. Los enzimas son biodegradables, suponiendo solo entre el 0,1% y 1% del sustrato. Siendo su contribución a la DBO en el canal de agua residual despreciable.

Las primeras aplicaciones industriales de las lipasas fueron en la industria farmacéutica como aditivos a productos que facilitaban la digestión. Otra aplicación industrial pionera en la hidrólisis enzimática de aceites animales, el problema de la hidrólisis de aceites de pescado es el gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados presentes en la composición del aceite. El tratamiento químico de la industria convencional proporciona una gran cantidad de reacciones secundarias y un complicado proceso de purificación. Este problema quedó obviado con la sustitución del proceso químico por un proceso enzimático que utilizaba lipasas y que aprovechando su especificidad y sus suaves condiciones de operación no proporcionaban reacciones secundarias. Esta misma compañía tiene también en funcionamiento un proceso catalizado por lipasas para la producción de ácidos grasos utilizados en la manufacturación de jabones.

#### ***Principales reacciones lipolíticas.***

Las principales reacciones catalizadas por enzimas lipolíticos que tienen aplicación industrial y que comienzan a sustituir a los procesos químicos convencionales son:

- Síntesis de triglicéridos.
- Hidrólisis de aceites vegetales.
- Síntesis de ésteres carbohidratados de ácidos grasos.
- Biomodificaciones de aceites y grasas.
- Preparación resolutive de ácidos y alcoholes racémicos.
- Hidrólisis asimétrica, esterificación y transesterificación.
- Síntesis de ésteres estereoselectivos y reacciones de interesterificación.
- Síntesis de precursores de péptidos y péptidos.
- Hidrólisis de grasas animales.

Las industrias en potencia que se pueden beneficiar de la utilización de enzimas lipolíticas en sus procesos se pueden resumir en: Industria oleoquímica. Industria alimentaria (láctea, pan). Fabricación de detergentes. Aplicaciones analíticas. Industria farmacéutica. Producción de biosurfactantes. Producción de cosméticos. Industrias de curtidos de pieles. Producción de saborizantes.

En la Industria Oleoquímica las principales aplicaciones de las lipasas son entre otras: la producción de ácidos grasos y glicerol a partir de la hidrólisis de triglicéridos, generalmente aceites vegetales, la síntesis lipídica como reacción inversa a la hidrólisis y la modificación de lípidos mediante interesterificación para conseguir variar las propiedades físico-químicas de los mismos, principalmente el punto de fusión.

Las lipasas tienen también un uso industrial habitual en la industria láctea como potenciadoras de sabores de ciertos quesos madurados naturalmente (queso azul, cheddar, romano y mozzarella). También para producir sabores de queso y mantequilla a partir de aceite de mantequilla y leche en polvo.

Otro uso potencial de las lipasas es actuar como componente funcional de mezclas en las formulaciones de detergentes, donde pueden tener interés para la eliminación de manchas de grasas particularmente a bajas temperaturas de lavado. Sin embargo el uso de enzimas lipolíticas en la formulación de detergentes ha sido restringido principalmente por que los surfactantes realizan su misma función (Macrae 1983).

Muchos enzimas encuentran un mercado en la investigación básica y en el análisis, las lipasas no son una excepción. Se requiere generalmente un enzima altamente purificado con una alta actividad enzimática y con una buena reproducibilidad entre ensayos. Como las cantidades necesarias para este uso son relativamente pequeñas las preparaciones que se obtienen son satisfactorias.

La especificidad de la lipasa ha sido explotada durante muchos años en la determinación de la estructura de los triglicéridos (Coleman 1963). Otro importante y corriente uso analítico de las lipasas es la determinación de lípidos, generalmente con propósitos clínicos, el concepto básico es utilizar la lipasa para generar glicerol a partir del triglicérido presente en la muestra y cuantificar el glicerol producido por vía química o enzimática (Bucolo y col. 1973), procedimiento que se encuentra

automatizado (Megraw y col. 1979). También han sido sugeridos métodos enzimáticos para la detección de ácidos grasos producidos durante la hidrólisis.

Incluso se han construido biosensores para determinación de triglicéridos. Estos requieren una inmovilización tanto de las lipasas como de los enzimas implicados en las reacciones posteriores (Aston y col 1984).

La industria farmacéutica realiza un extensivo uso de la biotecnología para la producción de productos de alto valor añadido, así por medio del uso de lipasas se llega a la producción de esteroides, estrógenos y varios corticoesteroides (Ratray 1984), síntesis de péptidos hidrofóbicos. Igualmente para la producción de muchos ésteres orgánicos importantes precursores de la síntesis química y que son ópticamente activos pudiendo resolver mezclas racémicas de compuestos quirales para sintetizar un ester o alcohol enantiomérico.

Todas las características propias de las lipasas las hacen una alternativa válida en las aplicaciones industriales actuales. Estas se podrían clasificar en los procesos generales de hidrólisis, síntesis y interesterificación.

### Hidrólisis.

Una de las aplicaciones principales es la obtención de ácidos grasos a partir de aceites y grasas. El proceso químico tradicional Colgate-Emery (Wang 1988) comporta la utilización de reactores que soporten las extremas condiciones del proceso necesarias para hidrolizar el enlace éster de los triglicéridos (50 atm., 250°C.). Este proceso dura aproximadamente 2 horas para lograr un porcentaje de hidrólisis comprendido entre el 96% y el 99%.

Los productos resultantes son ácidos grasos de un color oscuro, con presencia de otros productos como resultado de reacciones secundarias, y una solución acuosa diluida (10%) y con un ligero color de glicerol (Linfield 1984). Los ácidos grasos necesitan una destilación posterior que elimine el color y los productos secundarios. Mientras que el glicerol, después de su concentración, necesita generalmente una destilación que elimine el color y las impurezas. Como se deduce, el proceso comporta un elevado consumo energético y una variedad de reacciones secundarias indeseables, por ejemplo los ácidos grasos altamente insaturados pueden polimerizarse llegando a formar los anhídridos e incluso descomponerse éstos para producir cetonas e hidrocarburos.

Las principales ventajas de sustituir un proceso por la catálisis enzimática utilizando lipasas microbianas preferentemente no específicas para conseguir la total hidrólisis del aceite o grasa son:

- La no necesidad de un sustrato puro debido a la alta especificidad del enzima.
- Las reacciones se pueden realizar a una velocidad no muy diferente del proceso químico pero a unas condiciones de trabajo muy moderadas (40-60°, presión ambiental).
- Se produce el 100% de conversión.
- Generalmente se producen pocas o ninguna reacción secundaria con lo que la purificación posterior queda drásticamente reducida.
- El enzima puede ser utilizado, eventualmente, sin purificación, encontrándose disponibles comercialmente preparaciones enzimáticas tanto sin purificar como purificadas.
- Ofrecen menos peligros tóxicos que los catalizadores químicos (sodio metal, metóxido de sodio). Menor coste en el tratamiento residual y menor coste de capital de equipos.
- Mayor posibilidad de realizar un proceso en continuo, y uniformidad del producto obtenido.

Una segunda aplicación de la hidrólisis es la resolución de mezclas racémicas de compuestos quirales. Uno de los problemas más difíciles en el campo de la química fina "fine chemicals" es la producción de compuestos ópticamente activos. La importancia de este area se espera que crecerá y en el futuro habrá cada vez más compuestos quirales comerciales en los cuales solo uno de los enantiómeros es biológicamente activo. Los enzimas, debido a la naturaleza de su centro activo, poseen propiedades únicas que les permiten distinguir entre los enantiómeros. La capacidad de los enzimas hidrolíticos, y entre ellos las lipasas para actuar como un catalizador estereoselectivo, se conoce desde hace años y el interés en el tema crece continuamente.

### Síntesis.

Disminuyendo la concentración de agua presente en el medio de reacción es posible encaminar la reacción hacia la síntesis de ésteres. Las ventajas de las reacciones enzimáticas vuelven a tener potencial aplicación industrial como sustitutas de la síntesis de ésteres química que comporta trabajar con catalizadores inorgánicos a una temperatura entre 200 y 250 °C, siendo además la reacción química tediosa, no selectiva, con gran consumo de energía y la necesidad de una posterior

purificación. Se puede, mediante una adecuada selección del sustrato y del enzima, producir productos muy específicos.

Hoq (1984,1985) utilizan la síntesis de triolefina para comprobar el funcionamiento de su reactor de membrana para síntesis de triglicéridos. La concentración de agua presente en el medio es un parámetro clave para decidir si el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la hidrólisis o la síntesis, a bajas concentraciones de agua se producirá la síntesis. Ajima (1985) y Nishio (1987) realizan una modificación de la lipasa con polietilenglicol modificado para conseguir que sea soluble en solventes orgánicos, generalmente benceno, para la polimerización del ácido 10 hidroxidecanoico y la producción de ésteres de alcoholes terpenos. La producción de ésteres de alcoholes terpenos, como saborizantes, se comenta también en el trabajo de Marlot (1985) y Gillies (1987).

Otras posibles síntesis de interés se comentan en los trabajos de Matos (1987) para sintetizar péptidos. Seino (1984) Sintetizaron ésteres de carbohidratos de ácidos grasos de importancia como emulsionantes en la industria alimentaria, cosmética y medicina. Shaw (1987) prepararon ésteres de glucosa via hidrólisis del pentaacetato de glucosa catalizado por lipasas de importancia como sustancias antitumorales, inhibidores de la actividad del crecimiento vegetal.

### Interesterificación

La interesterificación es un proceso que se usa en la industria de aceites y grasas para modificar la composición de ácidos grasos y por consiguiente las propiedades físicas de las mezclas de triglicéridos, principalmente el punto de fusión de las grasas animales. En la industria química la interesterificación se consigue mediante la utilización de catalizadores como el metóxido de sodio o el sodio metal que provocan la migración del grupo acil entre las moléculas del triglicérido, siendo el producto resultante una mezcla de triglicéridos con el grupo acil aleatoriamente distribuido.

Estudios realizados demuestran que las lipasas microbianas se usan como catalizadores de las reacciones de interesterificación (Wisdom y col. 1985, Matsushima y col. 1986, Goderis y col. 1987). Aprovechando la reversibilidad de la reacción catalizada por la lipasa se provoca la ruptura y resíntesis causantes de las migraciones del grupo acil entre las moléculas de glicéridos dando productos de interesterificación.

Bajo condiciones en que la cantidad de agua en el sistema de reacción esté restringida se puede minimizar la reacción de hidrólisis para que la reacción dominante sea la interesterificación. En contraste con el proceso químico de interesterificación, en el enzimático se pueden utilizar mezclas de triacilglicérolas, los triglicéridos producidos son similares a los obtenidos por interesterificación química. Sin embargo si el catalizador es una lipasa específica la migración del grupo acil es confinada a la posición 1,3 del triglicérido, lo que no se puede obtener por interesterificación química.

#### **1.1.5. Producción de lipasas.**

Las primeras lipasas utilizadas provenían del páncreas de los mamíferos, de aquí su nombre de lipasa pancreática, pero en los últimos tiempos se han encontrado potenciales fuentes de lipasas en un gran número de microorganismos que abarcan hongos, levaduras y bacterias.

Algunos investigadores como Brockerhoff y Jensen (1974) opinan que hay demasiados microorganismos potenciales productores de lipasas, lo que repercute en una diversificación de las investigaciones que no ocurriría si existiera un número reducido, y por consiguiente no se conoce en profundidad cuáles son los mecanismos de producción del enzima ya que dependerá del microorganismo utilizado. No obstante cuando se realiza una búsqueda de lipasas comerciales de origen microbiano producidas por compañías americanas, europeas y japonesas se reduce drásticamente el número de microorganismos productores (Tabla 1.3).

Microorganismo	Compañía productora
<i>Candida rugosa</i>	Meito Sangyo Co. Sigma Chemical Co. Wothhington Biochemicals. Enzyme development corporation. Novo. Enzeco.
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sempa Chimie. Novo. Amano pharmaceutical. Boehringer. Hughes and Hughes.
<i>Rhizopus delemar</i>	Miles laboratories. Tanabe Seiyaku. Seppim.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano international enzyme Co.
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano international enzyme Co.
<i>Rhizopus japonicus</i>	Osaka Saiken laboratory.
<i>Geotrichum candidum</i>	Rhone-Poulenc Industries.
<i>Chromobacterium viscosum</i> <i>var. paralipolytica</i>	Toyo Jozo Co. Ltd. Finn Sugar Biochemicals.
<i>Aspergillus</i>	Amano Pharmaceutical Co. Novo. John and E. Sturge Ltd.
<i>Aspergillus niger</i>	Amano international enzyme Co.
<i>Pseudomonas</i>	Serva. Amano international enzyme Co.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano Pharmaceutical Co.
<i>Mucor sp.</i>	Amano international enzyme Co.
<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades. Novo industry.
Lipasa pancreática	Koch light laboratories.
<i>Alcaligenes</i>	Meito Sangyo.
<i>Phycomices niteus</i>	Takeda Yakuhin.
<i>Penicillium</i>	Amano.

Tabla 1.3. Microorganismos productores de lipasas empleados a nivel industrial

De esta tabla se concluye que las lipasas microbianas provenientes de *Aspergillus niger*, *Pseudomonas sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum candidum* y sobre todo de *Candida rugosa* y *Rhizopus sp.* son las más utilizadas para la obtención de lipasas comerciales. En los laboratorios de investigación que trabajan con enzimas comerciales para aplicaciones industriales de hidrólisis, síntesis e interesterificación el enzima comercial más utilizado es el proveniente de *Candida rugosa* o *Candida cylindracea*.

#### *Fuentes de carbono y nitrógeno.*

Independientemente del microorganismo empleado se utiliza, en una gran mayoría de medios, una fuente de carbono doble formada por un azúcar y un triglicérido. El azúcar, glucosa o sacarosa generalmente, tiene como objetivo el conseguir rápidamente el crecimiento del microorganismo, mientras que el triglicérido, generalmente aceite de oliva, tiene un efecto inductor en la producción de lipasas, este sustrato mixto se utiliza en el crecimiento y producción de *Candida rugosa*, *Candida lipolitica*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus*. La presencia de aceite de oliva en el medio puede ser sustituida por sustancias afines como triolefina, aceites vegetales, colesterol, sales biliares, ácido oleico y ácido linoleico (Valero 1990c).

Otras fuentes de carbono usadas fueron almidón soluble conjuntamente con aceite de oliva o grasa animal, salvado de arroz, extracto de levadura y sorbitol.

Las fuentes de nitrógeno más comúnmente utilizadas fueron la urea, la peptona y el licor de maíz, utilizándose aisladamente fuente de nitrógeno inorgánico en forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{CaNO}_3$ . En fermentaciones en que no se utilizaban lípidos como inductores utilizaban, como fuente de nitrógeno, licor de maíz o triptona, que podrían incorporar algún componente lipídico minoritario con efecto inductor.

En la tabla 1.4 se presenta un resumen de los datos sobre las condiciones de crecimiento y fuentes de carbono y nitrógeno para algunos microorganismos (Valero 1990c).

Microorganismo	T <sup>a</sup>	pH	t <sub>max</sub> (h)	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno
<i>Candida rugosa</i>	30	-	24	Sacarosa 2%	Urea 0,1%
<i>Candida parapolitica</i>	26,5	-	24	Glucosa 2%	Urea 0,6%
	30	-	-	Glucosa 2% aceite de oliva 0,2%	Urea 0,2%
	30	-	20	Glucosa 2%	Urea 0,2%
	30	-	16	Glucosa 2% Ácido oleico 0,5%	Urea 0,1%
	30	-	20	Glucosa 2% Ácido oleico 2%	Urea 0,6%
<i>Rhizopus japonicus</i>	30	6	72	Glucosa 1%	Peptona y otros
<i>Geotrichum candidum</i>	27	5,4	120	Glucosa 1% Aceite de oliva 1%	Peptona 5%
	30	7	68	Sacarosa 4%	Peptona 2%
	30	6,5	27	Aceite de oliva 1%	Urea 0,3%
	30	6,7	50	Aceite de oliva 2%	sulfato amónico 0,5%
	30	7	6	Aceite de oliva	Peptona
<i>Chromobacterium</i>	26	6,2	70	Almidón 2% Aceite de oliva 2%	Urea 0,1%
<i>Aspergillus niger</i>	35	7	96	Sacarosa 1% Aceite de oliva 2%	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 3%
<i>Penicillium cyclopium</i>	27	6	144	Salvado de arroz 5%	Licor de maíz 3%
<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	7,2	40	Extracto de levadura 0,5%	triptona 1%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23	6,5	70	Aceite de oliva 1%	sulfato amónico 0,6%
	23	6,5	90	Aceite de oliva 2%	sulfato amónico 0,5%

Tabla 1.4. Condiciones de crecimiento y fuentes de carbono y nitrógeno para algunos microorganismos.

### *Inductores e inhibidores de producción.*

Se define inductores como aquellas sustancias cuya presencia en el medio de cultivo provocan un aumento de la producción de lipasas, independientemente de la causa que provoque el aumento, e inhibidor como la sustancia cuya presencia en el medio disminuye totalmente o parcialmente la producción.

Debido a que los inductores e inhibidores dependen del microorganismo empleado para la producción se realiza una clasificación de los mismos en función del microorganismo. Así Ota y col. (1968) observan que la producción de lipasas por *Candida rugosa* se ve potenciada por la presencia conjunta en el medio conjuntamente de colesterol y aceite de oliva. También tienen efecto inductor aunque a niveles más bajos ácidos grasos como el láurico, palmítico y linoleico, triglicéridos como la tripalmitina, aceites naturales, y sustancias como el Tween y el Span que son ésteres de ácidos grasos, siendo el más efectivo el Tween 60, un éster del ácido palmítico. Actuaron como sustancias inhibidoras ésteres de ácidos orgánicos de cadena corta (butírico, acético).

En *Candida paratyolica* (Ota y col. 1968, 1972) comprobaron que aceites naturales ricos en ácidos grasos insaturados como castor oil son buenos inductores de la producción, mientras que aceites naturales ricos en ácidos grasos saturados como el aceite de coco no inducen la producción. Las sales biliares, necesarias en animales superiores para la absorción de lípidos fueron el mejor inductor.

Según Aisaka y Terada (1980) la producción de lipasas por *Rhizopus japonicus* se ve potenciada por algunas aceites naturales, aceite de oliva, linseed oil, rice bran oil, mientras que ácidos grasos saturados e insaturados, triglicéridos son inhibidores del crecimiento del microorganismo. La sustancia que más fuerte efecto inductor presenta es la lecitina.

Tsujisaka y col. (1973) trabajando con *Geotrichum candidum* comprobaron que el aceite de oliva presentó el mayor poder inductor. Los ácidos grasos como el oleico y el linoleico también potencia la producción, lo mismo que el Span 80 (Sorbitan monooleate). Tween 80, metilbutirato y glicerol no fueron sustancias inductoras. Según Chander y Klostermeyer (1983) los azúcares utilizados como única fuente de carbono ya potencian la producción de lipasas en *Geotrichum candidum* siendo la sacarosa el mejor aunque sin existir una gran diferencia entre ellos, mientras que la adición de

triglicéridos como aceites naturales, tributirina o trioleína retardan el crecimiento del microorganismo y la producción del enzima. Jacobsen y col. (1989) también utiliza el aceite de oliva como inductor y única fuente de carbono, igualmente, el ácido oleico y principalmente Tween 80 fueron también inductores de la producción. Según Vermeire y col. (1987) el aceite de oliva fue el mejor inductor en comparación con otros aceites vegetales, la adición de sustancias tipo Tween 80 tiene también un efecto inductor, probablemente tanto por la presencia de un enlace éster como porque la adición de tensoactivos a las fermentaciones de hongos estimulan la secreción de enzimas al interactuar con la pared fosfolipídica de la membrana celular.

Sugiura y col. (1975b) trabajando con *Chromobacterium* utilizaron como únicas fuentes de carbono aceite de oliva o grasa de procedencia animal. Nair y col. (1987) con *Aspergillus foetidus* utilizan sacarosa como sustrato de crecimiento y aceite de oliva como inductor. Pal y col. (1978) con cepa de *Aspergillus niger* reportan que la sacarosa es el mejor azúcar tanto para el crecimiento como para la producción, mientras que la presencia en el medio de material lipídico aunque retardan el crecimiento presentan un claro efecto inductor, siendo más acusado en el aceite de oliva. Este efecto inductor del aceite de oliva se observa también en la producción de lipasas por *Beauveria bassiana* Hegedus y col. (1988). Sztajer y Maliszewska (1988) comprobaron en *Penicillium citrinum* que la tributirina, y los aceites de oliva y de girasol tenían efecto inductor, de las fuentes de carbono empleadas el almidón demostró ser la más adecuada detectándose mínimos niveles de actividad lipolítica cuando la glucosa era el azúcar empleado y en una fase en que el microorganismo ya la había metabolizado, 72 horas desde el inicio de la fermentación.

Narasaki y col. (1968) investigando la producción de lipasas lipoproteicas con *Pseudomonas* demostraron que el aceite de oliva y el ácido esteárico son claros inductores, mientras que la glucosa presenta un efecto inhibitorio. Nuevamente los ácidos grasos de cadena corta tienen menor efecto inductor que los ácidos grasos de cadena larga.

### ***Sistemas de producción***

En la búsqueda del aumento de la producción del enzima por parte de los microorganismos, la Ingeniería genética ha realizado avances importantes con cepas modificadas genéticamente. De igual modo en el campo de la Ingeniería estas mejoras se realizan a nivel de sistemas de producción.

Los primeros estudios realizados (años 60 y 70) en la producción de enzimas y en concreto de lipasas, fueron en erlenmeyers. El seguimiento en este tipo de procesos de datos esenciales para la fermentación como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto son realizados off-line, lo que provoca una incertidumbre en los datos, así como impide una actuación inmediata.

En la década de los 80 se comienzan a introducir los primeros biorreactores en los laboratorios de investigación como equipos específicos para realizar fermentaciones, en los que se efectúa una monitorización en línea de las variables anteriormente mencionadas. Al mismo tiempo se incorporan sistemas automáticos de análisis que unidos a los modelos matemáticos facilitan la implementación de un control automático.

La baja productividad obtenida en discontinuo se mejora con la utilización de sistemas en semicontinuo. En la producción de lipasas por *Pseudomonas fluorescens* se consigue un aumento del 30 por ciento, alcanzándose valores de productividad 7 veces superiores cuando la adición se realiza en función del sustrato consumido (Suzuki y col. 1988).

Los cultivos en continuo no han sido tan utilizados para la producción, a pesar de esto se han realizado estudios con *Pseudomonas aeruginosa* (Gilbert y col. 1991) en los que se ha optimizado la producción de actividad lipásica en cultivos en continuo, con respecto a variables como la temperatura, pH y velocidad de dilución.

En referencia a la utilización de sistemas de inmovilización para la producción de enzimas extracelulares, concretamente enzimas lipolíticas, existen muy pocos trabajos publicados. En estudios realizados en la producción de lipasas por *Candida rugosa* inmovilizada en un soporte sólido (Ferrer y col. 1992), se ha destacado la necesidad de optimizar este tipo de sistemas para obtener mejores propiedades mecánicas y de transporte de gases, igual que niveles de toxicidad más bajos.

Finalmente el último sistema de producción no convencional de enzimas lipolíticas es el diseñado por Lechner y col. (1988) para la producción de lipasas por *Staphylococcus carnosus*. El biorreactor empleado constaba de dos compartimentos separados por una membrana de diálisis. Este sistema permitía ciertas ventajas, como es la concentración del enzima, evitando la contaminación por otros productos del medio y facilitando su posterior purificación.

### *Estabilidad de las lipasas*

Se ha observado a partir de fermentaciones en continuo que la influencia de factores externos, tanto en la fase de crecimiento exponencial como en la estacionaria, puede provocar una inestabilidad del enzima, que repercute en una visible actividad del mismo. Entre los factores que pueden desestabilizar o desactivar los enzimas se encuentran: la influencia de las proteasas, las condiciones ambientales y las fuerzas de cizallamiento.

Generalmente el efecto de las proteasas tiene lugar en la fase estacionaria del crecimiento, o bien en la fase de lisis celular. En esta fase las células se autodegradan liberando al medio todo tipo de enzimas intracelulares, entre ellos las proteasas. La aparición en el medio de lipasas y de proteasas, puede afectar al proceso desde dos puntos de vista: destruyendo parte de la lipasa ya formada y reduciendo la calidad del producto obtenido. Este segundo aspecto daría lugar a la necesidad de elaborar un proceso de purificación más complejo y por lo tanto más costoso.

Con respecto a las condiciones ambientales se han realizado numerosos estudios sobre la influencia de factores externos, como podrían ser temperatura, pH, concentración de iones metálicos y otros, que pueden afectar a la estabilidad del enzima (Borgström y col. 1984). Normalmente estos trabajos se realizan con soluciones del enzima purificado, sobre los que se realiza un estudio de estos factores que pueden suministrar información a tener en cuenta a la hora de mejorar las condiciones de operación.

Generalmente las lipasas son estables en soluciones acuosas a temperatura ambiente. Muchas lipasas microbianas extracelulares pierden su actividad si se almacenan a temperaturas superiores a los 40 °C. Algunas como las producidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus japonicus* y *Chromobacterium viscosum* son estables en soluciones por encima de los 50 °C. La lipasa proveniente del hongo termotolerante *Humicola lanuginosa* es estable a 60 °C (Macrae 1983). Una cepa de *Pseudomonas nitroreducans* produce lipasas a 70 °C y el enzima que proviene de *Pseudomonas fluorescens* es parcialmente inactivado únicamente a temperaturas elevadas (Borgström y col. 1984).

La mayoría de las lipasas presentan un intervalo ancho de pH en el que se mantiene su actividad lipolítica. Un rango óptimo común oscila entre pH = 6-8. Pero se encuentran lipasas provenientes de *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum* y *Rhizopus arrhizus* que son activas a

pH bajos, mientras que las lipasas que provienen de *Pseudomonas nitroreducens* son activas en la zona alcalina (pH = 11).

Las sales pueden tener un efecto de activación en la reacción lipolítica. Se ha de destacar particularmente la activación por parte de los iones  $\text{Ca}^{++}$  en lipasas de origen pancreático y microbiano. Algunas de las explicaciones de este hecho, apuntan sobre la estabilización de la estructura enzimática debido a las sales, y a la aceleración de la hidrólisis provocada por la eliminación de ácidos grasos libres para formar sales de calcio (Borgström y col. 1984).

Estudios realizados sobre mecanismos de inactivación debidos a fuerza de cizalla sobre *Candida cylindracea* (Lee y col. 1988) han revelado que la tensión interfacial es la causa de la desactivación del enzima, siendo las fuerzas de cizalla unos posibles inductores de este efecto, en el sentido de que favorecen la adsorción de la lipasa en la interfase.

En trabajos posteriores (Falk y col. 1991), se ha intentado resolver este tipo de problemas, minimizando el valor del área interfacial y maximizando la velocidad de transferencia de oxígeno, manteniendo concentraciones bajas de oxígeno disuelto a través de una agitación suave y caudales de areación menores.



### **1.3. Regulación de la síntesis enzimática.** **Bioquímica en la producción de lipasas.**

Los enzimas son proteínas, y como tales, la información biológica para su síntesis está contenida en el patrimonio genético celular. La expresión de esta información está sometida a un control dinámico por parte de la célula de manera que en respuesta a determinados estímulos, se puede alterar las proporciones de sustratos, enzimas, RNA, cofactores y otros constituyentes que permiten al organismo sobrevivir de forma eficaz frente a un ambiente cambiante. En efecto, las bacterias necesitan ser capaces de responder a los cambios bruscos del ambiente en el que se desarrollan. Debido a las condiciones bajo las que viven, pueden suceder variaciones caprichosas en el suministro de nutrientes en cualquier momento. De esta forma, la supervivencia de estos microorganismos depende de su facilidad de cambio en la metabolización de un sustrato a otro. Los organismos eucariotas unicelulares pueden compartir esta sujeción a un mundo incesantemente cambiante. Pero los organismos pluricelulares, más complejos, están restringidos a un conjunto más constante de rutas metabólicas y pueden no tener la misma necesidad de responder a circunstancias y estímulos externos.

La flexibilidad es, por lo tanto, un premio en el mundo de los microorganismos unicelulares. Por otra parte, también se requiere cierta economía, ya que una cepa que, desde el punto de vista energético utilice unas vías costosas para hacer frente a la demanda del ambiente, está en franca desventaja. A este respecto, sería gravoso en exceso producir todos los enzimas de una vía metabólica mientras el sustrato está ausente. Así el compromiso se encuentra en evitar la síntesis de enzimas de una ruta determinada, en ausencia de sustrato, pero en estar preparados en cualquier momento para producir los enzimas si el sustrato aparece.

Así pues, el conocimiento de estos mecanismos de control y regulación de la expresión genética, puede permitir al investigador, manipular las condiciones de cultivo de forma que, el microorganismo, exprese de forma óptima el enzima de interés, lo cual repercutirá en una mejora de los rendimientos de producción.

### *Regulación genética en bacterias.*

La expresión de un gen hasta formar una cadena aminoacídica de la correspondiente proteína, tiene lugar en un proceso en el que se pueden distinguir dos fases. En la primera, llamada transcripción, un complejo enzimático oligomérico, denominado RNA polimerasa, cataliza la síntesis de una molécula de RNA mensajero (mRNA), usando como plantilla un trozo de DNA determinado. En el segundo paso, la información contenida polipeptídica con la correspondiente secuencia de aminoácidos. Este proceso es conocido como traducción e involucra diversos componentes celulares como ribosomas factores proteicos y RNAs de transferencia, que portan los aminoácidos activados.

Aunque la regulación de la expresión se puede ejercer en cualquiera de las etapas antes citadas, en procariotas predomina ampliamente la que tiene lugar a nivel transcripcional. A grandes rasgos, este control se realiza a través de la variación de las tasas de iniciación y terminación de las cadenas de RNA. Esto involucra a secuencias específicas de DNA, regiones reguladoras, en las cuales interactúan ciertos elementos reguladores modulando la producción de moléculas de RNA.

Se puede considerar que hay dos tipos de sistemas de control genéticamente programados, uno activo y otro esencialmente estático. El primero, implica la puesta en marcha o detención de la transcripción de determinados genes en respuesta a señales fisiológicas específicas (respuesta adaptativa). En el control estático, la expresión está limitada por unas tasas predeterminadas de producción de RNA y de proteínas ya que la expresión está permanentemente en marcha (por ejemplo, las proteínas reguladoras se expresan, por lo general, de forma constitutiva).

El sistema de control de la expresión genética que primero se descubrió fue el del operón de la lactosa, cuyo modelo de funcionamiento propusieron Jacob y Monod en 1961. Ellos definieron el operón como una unidad completa de expresión genética, formada por genes estructurales (que codifican funciones enzimáticas o estructurales), un gen regulador (o genes) y elementos de control. Estas regiones de control son esencialmente dos secuencias de DNA, el promotor y el operador, que dirigen la síntesis de un único mensajero que engloba a todos los genes estructurales del operón. El control está modulado por la interacción del promotor con la RNA polimerasa y del operador con ciertas proteínas que impiden o activan la transcripción.

El concepto de operón fue fundamental ya que puede representar una ordenación que permite la regulación coordinada de un grupo de genes estructurales afines. Aunque el modelo original fue

concebido para el operón de la lactosa, se han utilizado argumentos similares para construir circuitos de control análogos para otros operones.

Generalizando, se pueden encontrar los sistemas de control negativo y positivo, que son definidos por la respuesta del operón cuando no hay proteína reguladora presente. Los genes bajo control negativo se expresan a menos que sean detenidos por la interacción de una proteína represora con su zona de control, impidiendo a la RNA polimerasa que inicie la transcripción. En los genes bajo control positivo, la expresión es posible tan sólo cuando una proteína reguladora activa (apoinductor) está presente. Esta proteína interactúa con el DNA y con la RNA polimerasa para fomentar la iniciación de la transcripción.

Por otra parte los operones pueden ser definidos como inducibles o represibles en función de su respuesta a pequeñas moléculas que regulan su expresión. Así como puede ser ventajoso inducir un juego de enzimas después de la adición del substrato inductor, también puede ser útil reprimir un juego de enzimas que sintetizan algún compuesto, si este está presente en cantidades adecuadas en el medio. Así, los operones inducibles funcionan sólo en presencia de la pequeña molécula inductora, mientras que los represibles funcionan sólo en presencia de la pequeña molécula inductora, mientras que los represibles funcionan sólo en ausencia de la pequeña molécula correpresora (para diferenciarla de la proteína represora).

Los conceptos de control positivo y negativo y de operón inducible y represible, se pueden combinar para configurar un conjunto de circuitos de control versátiles (Lewin 1983).

### ***Regulación genética en levaduras.***

Las levaduras son organismos eucariotas y por tanto poseen un grado de complejidad considerablemente superior al de las bacterias. Sus mecanismos de regulación genética son bastante menos conocidos que los de estas últimas y seguramente mucho más complejos. En efecto, la búsqueda de operones en eucariotas ha sido infructuosa. Sin embargo, se puede considerar que el esquema general se mantiene: secuencias de un determinado gen colocadas en *cis* juegan un papel de promotores-operadores, mientras que proteínas que actúan en *trans*, reprimiendo o activando la transcripción, influyen sobre varios genes simultáneamente. No obstante, estos genes están usualmente

desperdigados por el genoma y poseen cada uno su propio promotor-operador. En el caso de que varios genes, sometidos a regulación común estén ligados, se transcriben independientemente.

Se conocen con cierto detalle una serie de ejemplos de regulación genética de ciertas funciones metabólicas, como son la utilización de la maltosa (la más cercana reminiscencia del operón), la utilización de la galactosa, síntesis de fosfatasas, de aminoácidos, etc. De los modelos de regulación de estos sistemas se pueden extraer ciertas características generales.

Parece ser que en estos organismos, la velocidad a la cual un gen determinado se expresa, es controlada tanto a nivel de transcripción como de traducción. Los niveles de transcripción están determinados, en parte, por las secuencias promotoras (bastante diferentes de las bacterianas) situadas a contracorriente del "sitio" de iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras situadas a contracorriente son aquellas que están en la zona de la molécula de DNA antes del inicio de la transcripción (extremo 5' del gen).

Cada promotor contiene secuencias reguladoras cerca del inicio de transcripción (secuencias de iniciación y las cajas TATA), así como otras capaces de activar o reprimir la transcripción a distancia: UAS (Upstream Activating Sequences) y URS (Upstream Repressing Sequences). Las primeras se unen a las proteínas de control positivo y las segundas a las de control negativo. Algunos elementos situados a contracorriente, actúan de forma independiente del ambiente intracelular (expresión constitutiva), mientras que otras están reguladas por proteínas cuya actividad está controlada metabólicamente (expresión regulada).

Por otra parte, la cromatina parece estar implicada en la regulación. Estudios en *Saccharomyces* muestran la existencia de regiones que flanquean ciertos "loci" con una estructura de la cromatina diferenciada por su sensibilidad a las nucleasas. Esta sensibilidad del DNA puede ser consecuencia de una estructura diferente de la cromatina en esa región e incluso de la posible existencia de formas de DNA distintas de la normal. Así, en la región promotora de gen *CYC 1* (iso-1-citocromo c) podría contener hélices Z.

En resumen:

- Existen factores que regulan la expresión de forma negativa y positiva.
- El(los) factor(es) negativo(s) inactiva(s) un factor positivo.

- En algunos casos, otros factores positivos deben su carácter a que inactivan un factor negativo, lo que permite la función de un factor positivo directo (del Castillo, 1985).

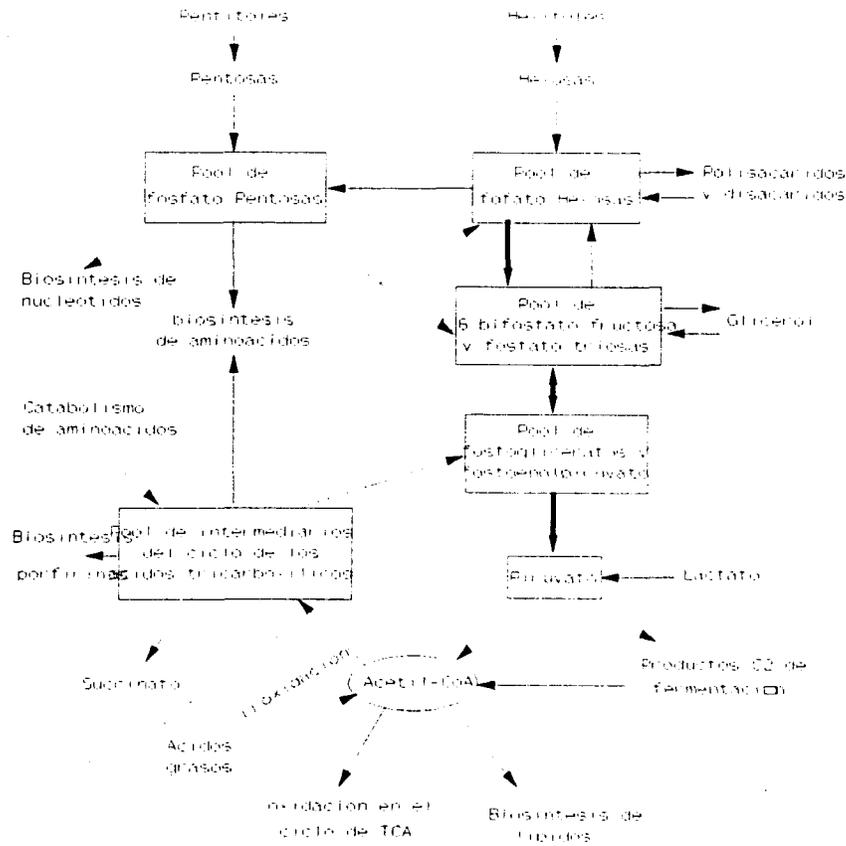
### *Metabolismo de las levaduras.*

En la figura 1.3 se presenta un esquema general sobre el metabolismo del carbono y energía en levaduras. La glucosa, fructosa y manosa son utilizadas por más de 400 especies descritas de levaduras (Barnett, 1976). Por el contrario, se encuentran grandes diferencias entre especies en la utilización de otras fuentes de carbono, tales como otros azúcares (Barnett, 1976) o aminoácidos (Santa María and Sánchez, 1977). La conversión de la glucosa 6-fosfato en piruvato mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas es el proceso común en el metabolismo de los carbohidratos por las levaduras. La entrada hacia la vía metabólica varía dependiendo del azúcar, mientras que el consiguiente destino del piruvato depende tanto del azúcar que se está utilizando como de la especie de la levadura.

Dependiendo del destino del piruvato que se está obteniendo de la glucosa, las levaduras se pueden dividir en dos grupos los aerobios estrictos y los anaerobios facultativos (Rose, 1989). Los primeros son incapaces de utilizar la glucosa en ausencia de oxígeno. De este modo, su metabolismo es exclusivamente respiratorio, y el piruvato es canalizado hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para ser oxidado. Los anaerobios facultativos son capaces de utilizar la glucosa bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. En el último caso metabolizan la glucosa hacia etanol (fermentación alcohólica clásica). Durante el crecimiento aeróbico la fermentación y la respiración contribuye al catabolismo de la glucosa. Dependiendo de la magnitud de esta contribución se pueden hacer dos subgrupos, las levaduras fermentativas y las respiratorias.

Cuando el crecimiento se realiza sobre fuentes de carbono que no son azúcares es necesaria la aerobiosis. Los productos finales de fermentación, tales como etanol o glicerol, pueden ser utilizados para el crecimiento si está presente el oxígeno. El crecimiento bajo estas condiciones depende del funcionamiento de ciclo TCA (Figura 1.4).

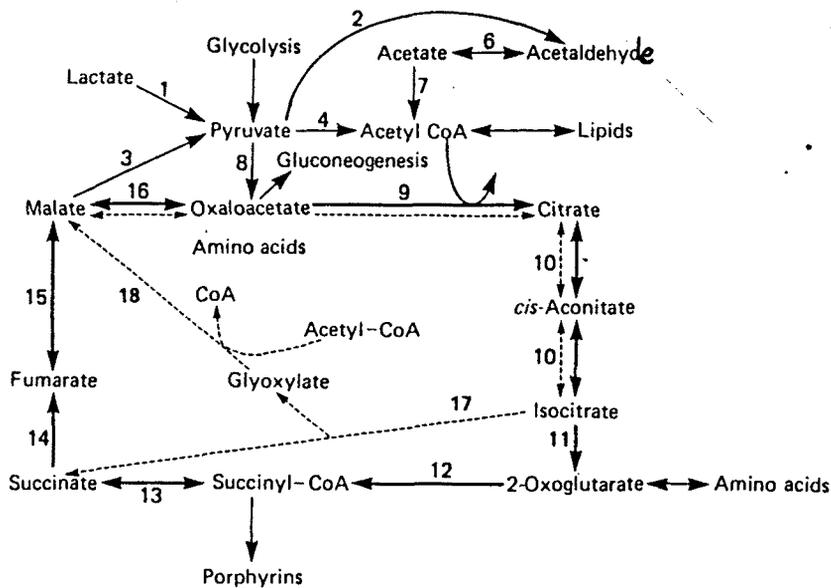
La principal entrada del ciclo es el acetil-CoA, además de algunos aminoácidos que pueden entrar al ciclo a diferentes niveles. A parte de su papel como maquinaria oxidativa, el ciclo TCA representa el lugar donde los intermediarios catabólicos y anabólicos se interconvierten. Este hecho



**Figura 1.3.** Esquema general sobre el metabolismo del carbono y energía en levaduras.

explica la necesidad de reacciones que realimenten el ciclo y la existencia de reacciones de conversión de intermediarios del ciclo en precursores biosintéticos.

La utilización de fuentes de carbono que no sean carbohidratos implica un cambio de sentido de todas o algunas de las reacciones glicolíticas. Este proceso se conoce como gluconeogénesis, y es necesario para la síntesis de hexosas monofosfato por las levaduras creciendo bajo las condiciones anteriormente mencionadas (Figura 1.5.). La parte de la glicólisis entre la fructosa 1,6-difosfato y fosfoenolpiruvato no posee problemas especiales, ya que todas las reacciones implicadas son fácilmente reversibles y durante la glicólisis, operan próximas al equilibrio. Los dos pasos glicolíticos fisiológicamente irreversibles que deben ser cambiados de sentido en la gluconeogénesis son catalizadas por los enzimas fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa. Se necesitan dos enzimas adicionales para eludir estas reacciones. Estos enzimas son la fructosa-1,6-difosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.



Scheme of the citric acid and glyoxylate cycles and related pathways. Bold arrows indicate reactions of the TCA cycle; dashed arrows those of the glyoxylate cycle. Cofactors are not shown. Net balances:

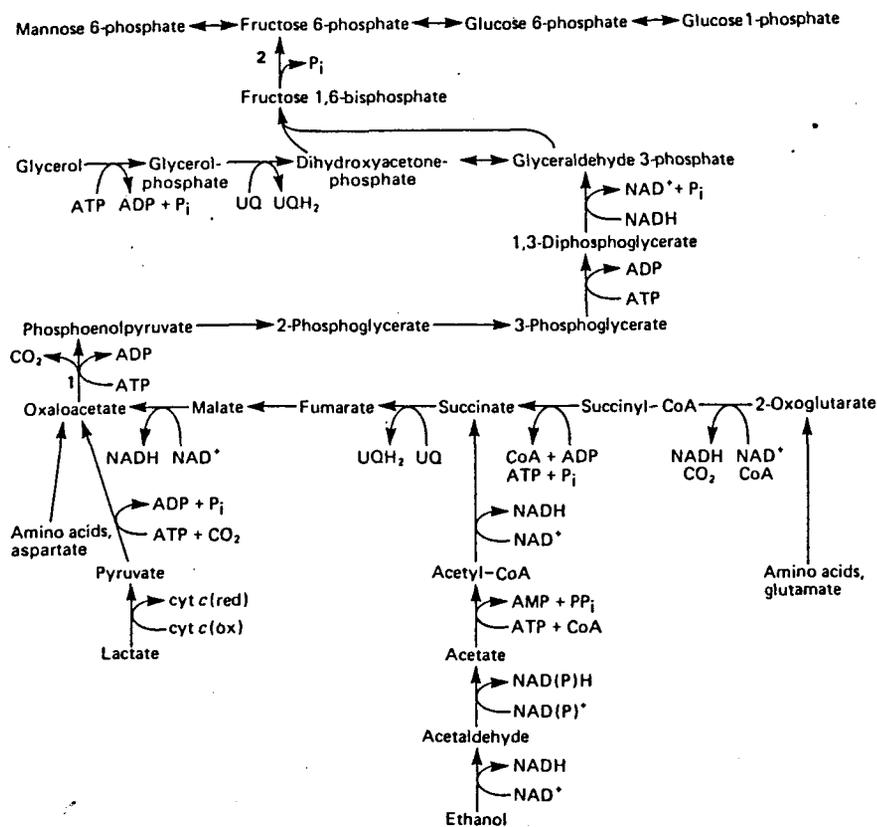
- (i) TCA cycle:  $\text{acetyl-CoA} + 3\text{NAD}^+ + \text{UQ} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow 2\text{CO}_2 + 3\text{NADH} + \text{UQH}_2 + \text{ATP} + \text{CoA}$ .
  - (ii) Glyoxylate cycle:  $2\text{acetyl-CoA} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{succinate} + \text{NADH} + 2\text{CoA}$ .
- Enzyme notations are: 1, lactate dehydrogenase (cytochrome b<sub>2</sub>) (Labeyrie *et al.*, 1978); 2, pyruvate decarboxylase (Ullrich and Kemfle, 1969); 3, malic enzyme (Fuck *et al.*, 1973); 4, pyruvate dehydrogenase complex (Keha *et al.*, 1982); 5, alcohol dehydrogenase (Wills and Jornwall, 1979); 6, acetaldehyde dehydrogenase (Tamaki and Hama, 1982); 7, acetyl-CoA synthetase (Frenkel and Kitchens, 1977); 8, pyruvate carboxylase (Young *et al.*, 1969); 9, citrate synthase (Weitzman and Dawson, 1976); 10, aconitase (no information available for yeast); 11, isocitrate dehydrogenase (Barnes *et al.*, 1971); 12, 2-oxoglutarate dehydrogenase (Hirabayashi and Harada, 1971); 13, succinyl-CoA synthase (no information available in yeast); 14, succinate: ubiquinone oxidoreductase (no information available for yeast); 15, fumarase (Catalai and Stoppani, 1966); 16, malate dehydrogenase (Hägele *et al.*, 1978); 17, isocitrate lyase (Olson, 1959); 18, malate synthase (Dixon *et al.*, 1960).

**Figura 1.4.** Esquema de los ciclos del ácido cítrico, glioxalato y vías relacionadas.

**Oxidación de los ésteres de acil-CoA y ácidos grasos.**

Existen tres vías principales para la degradación de ácidos grasos por las levaduras: la alfa, beta y omega oxidación, de las cuales probablemente la beta-oxidación es universal y por ello la más importante. El crecimiento sobre alcalinos o ácidos grasos induce rápidamente la formación de peroxisomas, los cuales contienen el sistema completo para la beta-oxidación de los ésteres de acil-CoA grasos (Kawamoto y col. 1978), al igual que la inducción de formación de los enzimas de la omega-oxidación en ciertas levaduras.

El ciclo de la beta-oxidación (Figura 1.6) está catalizado por cuatro enzimas. El primer enzima es un acil-CoA deshidrogenasa o acil-CoA oxidasa, el cual cataliza la deshidrogenación de

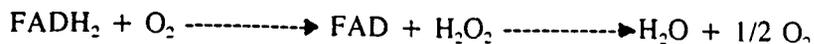


Scheme of gluconeogenesis. Specific gluconeogenic enzymes are: 1, phosphoenolpyruvate carboxykinase; 2, fructose-1,6-bisphosphatase. Net balances (UQ indicates ubiquinone):

- (i) From ethanol:  $4\text{ethanol} + 12\text{NAD}^+ + 4\text{CoA} + 8\text{ATP} + 2\text{UQ} \rightarrow \text{hexose phosphate} + 12\text{NADH} + 4\text{AMP} + 4\text{ADP} + 2\text{CO}_2 + 2\text{UQH}_2 + 11\text{P}_i$
- (ii) From glycerol:  $2\text{glycerol} + 2\text{UQ} + 2\text{ATP} \rightarrow \text{hexose phosphate} + 2\text{UQH}_2 + 2\text{ADP} + 3\text{P}_i$

Figura 1.5. Esquema de la gluconeogénesis.

la cadena acil saturada dando lugar a un trans 2,3-enoil-CoA éster. La diferencia entre la deshidrogenasa y la oxidasa es principalmente el requerimiento de cofactor. Además, la diferencia clave entre los dos enzimas reside en su localización: la oxidasa es peroxisomal y la deshidrogenasa es mitocondrial. En los peroxisomas, la reoxidación del  $\text{FADH}_2$ , el cual se produce de la oxidación no está ligado a la producción de ATP (como en el caso del NADH y el sistema mitocondrial), pero está ligado a la catalasa:



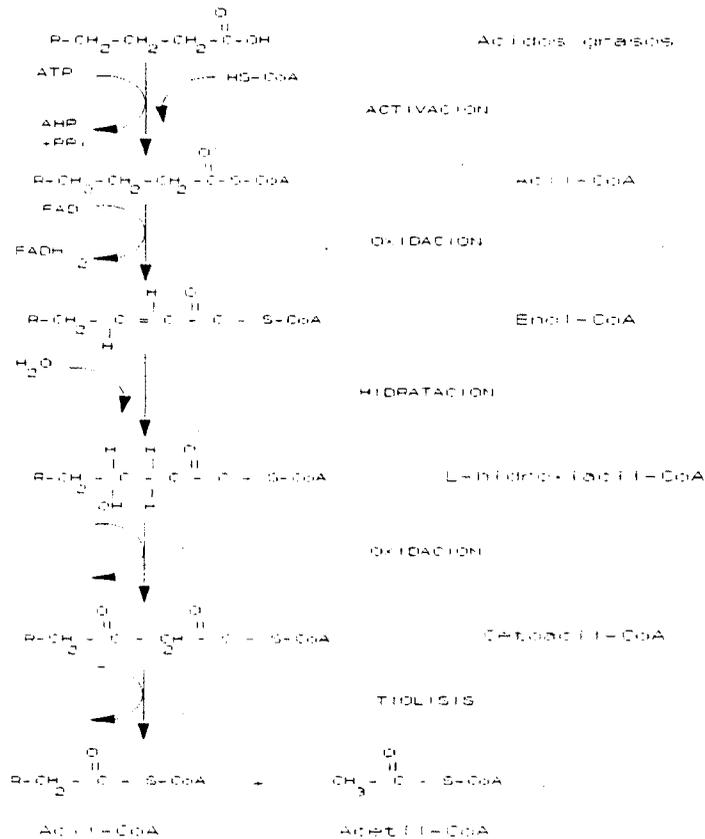


Figura 1.6. Ciclo de la beta-oxidación.

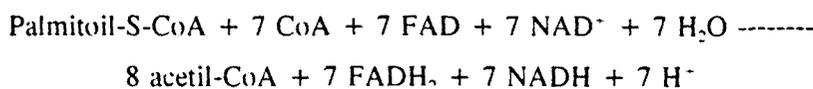
La segunda reacción de la beta-oxidación está catalizada por una enoil-CoA hidratasa formando 3-hidroxiacil-CoA. Este compuesto es entonces reducido por una segunda deshidrogenasa, la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, con NAD<sup>+</sup> como aceptor específico de electrones. Además, este enzima es inespecífico respecto a la longitud de cadena del ácido graso, es absolutamente específico para el isómero L. El NADH, el cual está generado en esta reacción es reoxidado estando ligado a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa:



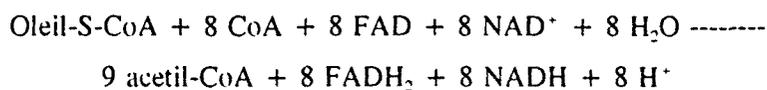
Entonces la glicerol 3-fosfato puede dejar los peroxisomas para ser oxidada bien en el citosol o en las mitocondrias.

El último paso en el ciclo está catalizado por una acetil-CoA acetiltransferasa o 3-oxoacil-CoA tiolasa, la cual rompe el enlace entre los C-2 y C-3 para obtener acetil-CoA y una molécula de acil-CoA con dos átomos de carbono menos que el sustrato original. El último enzima también se encuentra en múltiples formas con diferentes especificidades respecto a la longitud de cadena. El acil-CoA de cadena larga generado por la reacción de la tiolasa, se convierte ahora en el sustrato para primera reacción de deshidrogenación y formar de nuevo otro acetil-CoA y una molécula más corta de un acil-CoA de cadena larga, disminuido en dos carbonos.

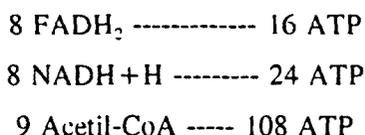
El ácido palmítico recorre siete veces el ciclo, obteniéndose ocho moléculas de acetil-CoA. Tan sólo es necesaria una reacción de activación, al final de cada ciclo, ya que el ácido graso aparece siempre como el CoA tioéster correspondiente. El balance global se podría expresar como:



Los ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico, son oxidados mediante la misma vía general hasta que la cadena acil es recortada para llegar al doble enlace. Así el balance global para la degradación del ácido oleico a partir de su tioéster CoA sería:



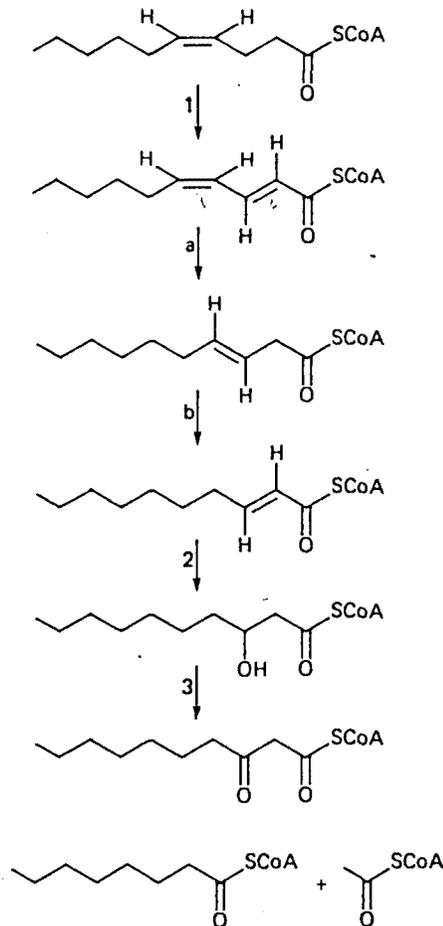
Haciendo un balance de energía para cada molécula de ácido oleico, se tendría que sumando las contribuciones de la fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs:



Se tendrían 148 ATP a los que hay que restar los correspondientes a los enlaces de alta energía, con lo que finalmente serían 146 ATP por molécula de ácido oleico degradada.

La enoil-CoA hidratasa es específica para  $\Delta^2$ -trans, mientras que los dobles enlaces de la mayoría de los ácidos grasos son cis. Además, los dobles enlaces se encuentran normalmente en tales posiciones que el sucesivo recorte de fragmentos de  $\text{C}_2$  producen ésteres de acil-CoA y ácido graso  $\Delta^3$ -insaturados. De este modo, con la adición de dos enzimas más, la 2,4-dienoil-CoA reductasa y

la enoil-CoA isomerasa se resuelven estos problemas. En la figura 1.7 se puede observar como se realiza la degradación de un ácido graso insaturado utilizando la beta-oxidación.



Pathway of the  $\beta$ -oxidation cycle with an unsaturated fatty acyl-CoA (dec-4-enoyl-CoA).  
a indicates 2,4-dienoyl-CoA reductase, b indicates 2,3-enoyl isomerase. From Dommes et al. (1983).

*Figura 1.7. Ciclo de la beta-oxidación con un éster de ácido graso y acil-CoA insaturado.*

## **1.4. Metodología de la modelización.**

Un modelo matemático de un proceso es un conjunto de ecuaciones que relacionan las variables del sistema de modo que, la solución de estas ecuaciones describe el comportamiento. El modelo es el resultado del conocimiento que se tiene sobre el sistema. Modelizando, a partir de aquello que se conoce del sistema se formulan unas hipótesis que pretenden explicar las observaciones que se realizan. Estas hipótesis se traducen en el modelo, de manera éste tendrá validez mientras la tengan las hipótesis.

Dependiendo de cual sea el propósito o motivación de la construcción del modelo, se determinará frecuentemente su naturaleza y justificará la existencia de diferentes modelos de una misma entidad, según cuál sea la finalidad perseguida. La manipulación del modelo busca obtener la información que se necesita para conseguir un objetivo específico como: diseño, cambio de escala, puesta en marcha, operación, paradas, control, optimización,... El tipo de modelo necesario para satisfacer estos objetivos puede ser completamente distinto. Así, para el diseño de un sistema se requiere de un modelo más bien detallado, generalmente de tipo no lineal y basado en la suposición de estado estacionario, mientras que para el control del mismo sistema es frecuente la utilización de un modelo más sencillo, linealizando en las proximidades de las condiciones de operación, con el objetivo de describir el comportamiento en estado no estacionario del sistema frente a pequeñas perturbaciones de las variables de proceso.

### **1.4.1. Construcción y estructura matemática de un modelo.**

La información contenida en un modelo matemático, independientemente de su naturaleza matemática, nivel de descripción, complejidad, etc. puede clasificarse en tres grandes bloques: ecuaciones de conservación, ecuaciones cinéticas y restricciones.

Las ecuaciones de conservación o balances son la representación matemática de algunas leyes básicas como las de la conservación de la materia y energía, la segunda ley del movimiento de Newton (balance de cantidad de movimiento), etc., y en el caso de que exista reacción química o bioquímica, la estequiometría de la reacción. Proporcionan información acerca de la magnitud de la transformación que se efectúa.

Las ecuaciones cinéticas proporcionan información sobre la velocidad con que se producirán los intercambios de materia, energía y cantidad de movimiento, así como de las reacciones que tienen lugar. Este es un tipo de información que se obtiene casi exclusivamente por vía experimental y relaciona la velocidad de los procesos físicos (transporte de materia, energía y cantidad de movimiento) y químicos o bioquímicos con variables intensivas del sistema, tales como temperatura, pH, concentración de biocatalizador, de substratos y productos, etc.

El tercer bloque está constituido por información que no se puede clasificar en ninguno de los anteriores y que tiene naturaleza diversa., La más fundamental es la perteneciente a las restricciones impuestas por las leyes de equilibrio, tanto físico como químico. Otros tipos de restricciones actúan sobre el sistema y que deben incorporarse al modelo son las derivadas de la legislación, normas de seguridad, condicionamientos económicos, etc.

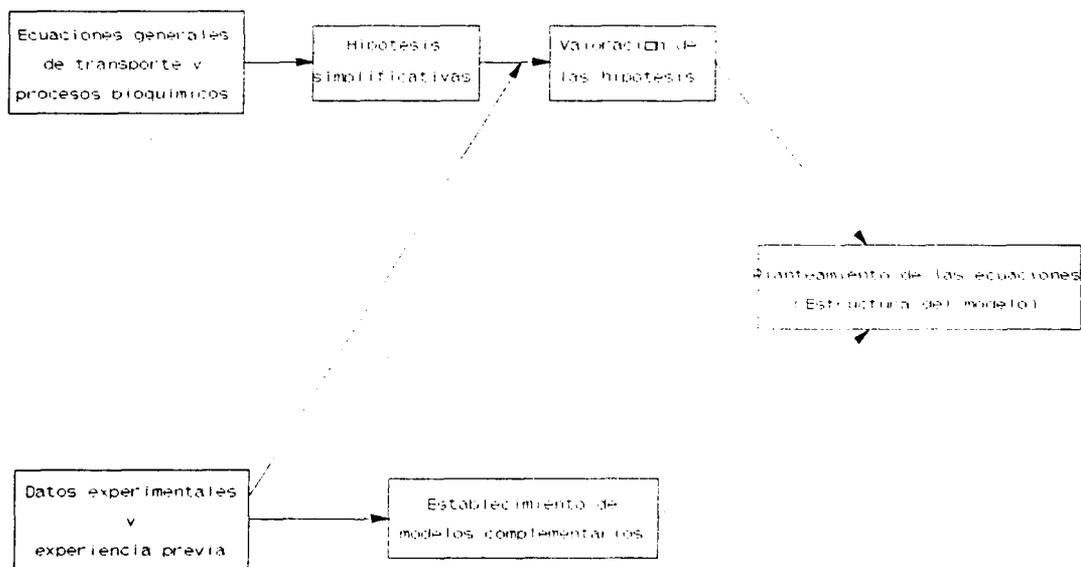
La construcción de un modelo matemático, formado por los tres tipos de información antes mencionados, puede plantearse para un mismo sistema, a diversas escalas de detalle o niveles de descripción, relacionados con la complejidad del detalle físico que se utiliza en la descripción del proceso (Himmler 1976). Por orden decreciente de detalle se definen como: nivel atómico o molecular, microscópico o diferencial y macroscópico o integral.

La descripción más fundamental de los procesos debiera basarse sobre consideraciones moleculares. La descripción molecular se caracteriza porque trata un sistema arbitrario como compuesto de entidades individuales, cada una de las cuales sigue ciertas leyes. En consecuencia, las propiedades y variables de estado del sistema se obtienen como suma de las de todas las entidades. Se utilizan métodos típicos de la mecánica cuántica, mecánica estadística, termodinámica de los procesos irreversibles...

Una clase de modelos, con un fundamento básico algo menor, corresponde a lo que se llama descripción microscópica. Corresponde a un tratamiento fenomenológico del sistema e implica, que el sistema (la materia) puede considerarse como continuo; es decir, se ignora las interacciones moleculares detalladas y al mismo tiempo se utilizan ecuaciones diferenciales para la expresión de los balances que contienen conceptos tales como densidad o concentración en un punto, incompatibles con la consideración discreta de la materia.

Con frecuencia no se desea analizar un proceso con todo el detalle interno de los modelos microscópicos, sino que el modelo ignora toda estructura o detalle dentro del sistema, que se contempla así como una especie de caja negra, de modo que en el planteamiento matemático no intervienen gradientes espaciales. Esta pérdida de detalle simplifica notablemente la descripción matemática, pero como contrapartida, lleva consigo una pérdida de información sobre el comportamiento del sistema.

El desarrollo de un modelo es un proceso de naturaleza cíclica que se inicia sobre la base de un modelo verbal bien formulado, en el sentido de que los objetivos del modelo se hayan definido explícitamente, y que evoluciona a medida que aumenta la comprensión que se tiene del sistema (medida por simulaciones cada vez mejores) así como del progreso conceptual sobre los mecanismos básicos de su comportamiento (dado por mejores modelos (Smith 1974)). En la figura 1.8 se esquematiza el proceso de elaboración de un modelo.



**Figura 1.8.** Esquema sobre el proceso de elaboración de un modelo.

La revisión de ideas y el desarrollo de modelos no es necesariamente en la dirección de aumentar la complejidad o el número de parámetros, sino que puede ser hacia la simplificación y la reducción del número de parámetros. Aunque es ciertamente convincente el hecho de poder representar una situación complicada con pocas constantes, la presencia de parámetros ajustables

siempre se ha de considerar con precaución. Una parte muy importante de la confianza que se puede tener en un modelo proviene de si sus parámetros pueden ser obtenidos a partir de fuentes independientes, de forma que al no combinarlos interactivamente en el modelo se obtiene una representación adecuada de la realidad.

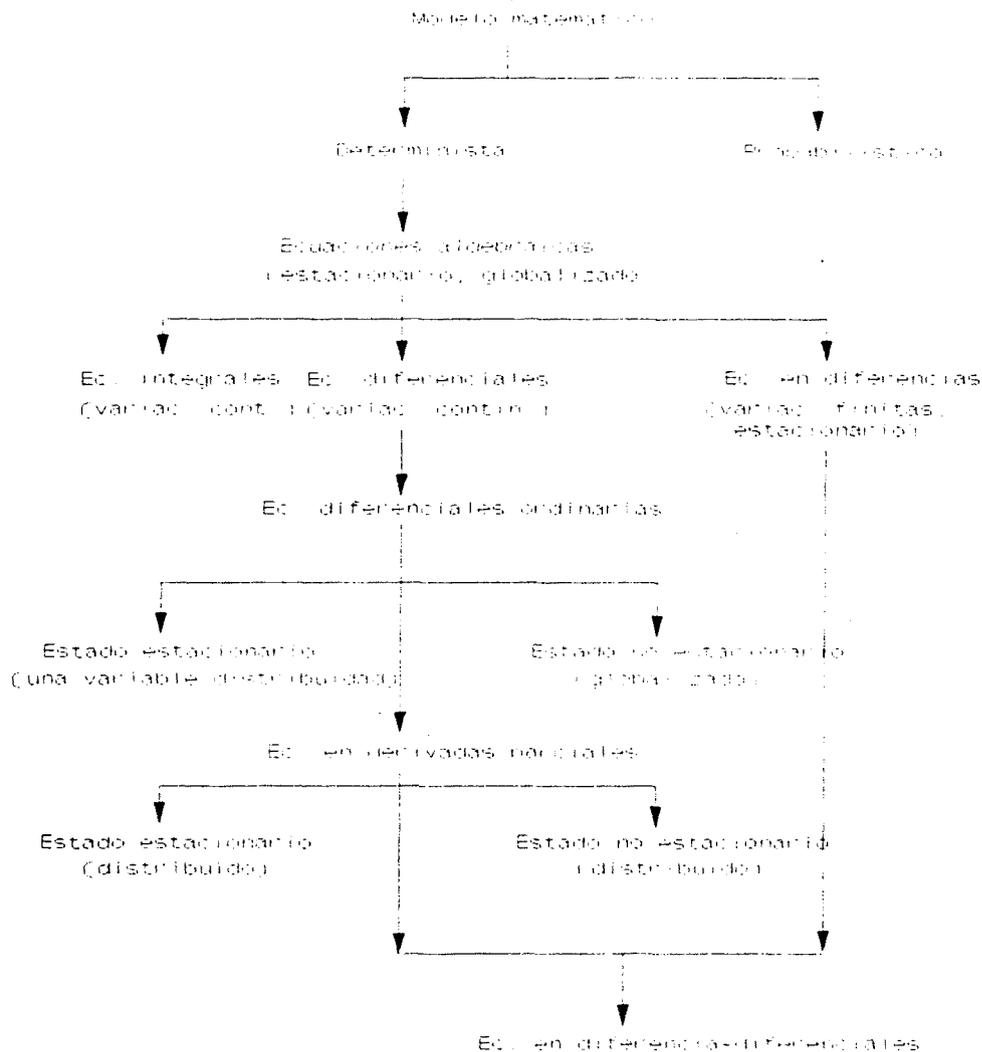
Para evitar complicaciones matemáticas innecesarias, una vez que se ha escrito una primera versión, debe de realizarse una depuración del mismo para que describa sólo los fenómenos más relevantes: la clave de la construcción de modelos radica en encontrar la relación óptima entre simplicidad y fiabilidad con vistas a los objetivos que se persiguen (Kossen 1985). Posteriormente a la reducción del modelo se procede a la solución de las ecuaciones (analítica o numéricamente, con la ayuda del ordenador) y a continuación a un análisis de sensibilidad del modelo respecto de los diversos parámetros que contiene, para detectar así cuáles han de determinarse con mayor precisión. La etapa siguiente consiste en una serie de experimentos que pondrán a prueba el modelo desde un punto de vista cualitativo, en el sentido de que las tendencias sean bien descritas y que permitirán la optimización de aquellos parámetros ajustables que pueda contener el modelo. Después de la optimización de parámetros se procede a la evaluación crítica del modelo, que se ha de realizar por medio de nuevos experimentos, diferentes de los utilizados para la optimización de parámetros y preferiblemente, en condiciones de operación también diferentes (validación del modelo).

A parte de poderse realizar una clasificación teniendo en cuenta el detalle físico interno utilizado, existen otras formas de clasificación, hechas desde el punto de vista de la naturaleza de las ecuaciones del modelo. Una primera clasificación mediante parejas antagónicas es la siguiente: determinista/probabilístico, lineal/no lineal, estado estacionario/estado no estacionario, globalizado/distribuido. En una segunda clasificación teniendo más en cuenta la estructura de las ecuaciones implicadas sería: según la fig 1.8b.

#### 1.4.2. Métodos de optimización.

Una vez que el problema a ser optimizado está definido de algún modo hay diferentes métodos de poderlo resolver que se pueden clasificar en:

1) **Métodos analíticos.** Utilizan las técnicas clásicas del cálculo diferencial. Estos métodos calculan los valores de las variables que hacen cero las derivadas de la función  $f(x)$  que interesa



**Figura 1.86** Clasificación de los tipos de modelos

optimizar. Para la aplicación de los métodos analíticos, el problema a optimizar ha de estar definido en términos matemáticos, pudiéndose entonces manipular por los procedimientos habituales. Para problemas de gran complejidad y especialmente no lineales, estas técnicas han demostrado no ser demasiado satisfactorias.

2) **Métodos numéricos.** Utilizan procedimientos iterativos para obtener a partir de la información precedente mejoras sucesivas que permitan llegar al óptimo. Estos métodos son los que se aplican para resolver los problemas que no se pueden resolver analíticamente, que son la mayoría en situaciones reales. Estos métodos son los más empleados.

## Introducción

---

**3) Métodos gráficos.** Consisten en la representación de la función a ser optimizada en función de las variables independientes, determinándose el óptimo mediante una inspección de la misma. Estos métodos presentan la ventaja de su sencillez y que pueden indicar la existencia de diferentes óptimos o la no existencia de los mismos.

**4) Métodos experimentales.** Determinan el valor de la función a ser optimizada mediante experimentación mejor que manipulando las ecuaciones matemáticas que describen el proceso. Pueden aplicar los criterios de optimización para decidir donde situar el siguiente experimento a realizar, para que la información obtenida sea máxima.

**5) Métodos de estudio de casos.** Estudian diferentes alternativas de un mismo problema para determinar cual es la mejor, que puede no ser la óptima.

Aunque en los estudios de optimización se intenta conseguir el mejor resultado, no siempre se logra el óptimo absoluto, ya que las variables pueden tener restringido su campo de variación. El óptimo absoluto puede caer fuera de él, por ejemplo puede ser que al estimar el óptimo en un proceso se determinen concentraciones negativas, constantes de velocidad negativas, etc. Este fenómeno dará lugar a las llamadas restricciones. De esta manera se tendrán métodos apropiados para problemas de optimización con o sin restricciones.

Por otra parte se podrán diferenciar problemas de optimización lineales o no lineales dependiendo de si las ecuaciones que definen el problema son algebraicas lineales o no. La optimización no lineal intenta minimizar el valor de una función no lineal  $f(x)$ , donde  $x$  es un vector de  $n$  variables independientes. A grandes rasgos los métodos de optimización no lineal con restricciones se pueden clasificar en dos grandes grupos: los métodos de gradiente y los métodos de búsqueda directa (Murray y col., 1985).

Los métodos de gradiente utilizan la información suministrada por las derivadas de la función  $f(x)$  para escoger la dirección de la siguiente iteración para corregir el valor de  $x$ . En el grupo de métodos de búsqueda directa no se utilizan las derivadas de la función.

Los métodos de gradiente suponen que la función a optimizar es continuamente derivable hasta el segundo orden. En caso de no disponer de las derivadas analíticas (como el caso presente) hay que aproximarlas por un método de diferencias finitas.

$$df(x)/dx \approx [f(x + \Delta x) - f(x)]/\Delta x$$

Entre los métodos de gradiente más utilizados se encuentran : a) Método del descenso más rápido y b) Método de Davidon-Fletcher-Powell [DFP] (Himmelblau, 1976).

### **1.4.3. Calibración y validación del modelo.**

#### *Calibración.*

Al plantear las ecuaciones que configuran el modelo aparecen diferentes parámetros que deben ser evaluados de forma tal que permitan una solución del modelo lo más ajustada al comportamiento del sistema en estudio. Estos parámetros (cinéticos, físicos, etc..) son evaluados confrontando los valores calculados por el modelo con valores experimentales.

Una de las ventajas que proporciona el establecimiento de un modelo es la necesidad de recopilar y sistematizar conjuntos de informaciones a partir de las cuales se mejora apreciablemente el conocimiento del mismo.

La estimación de parámetros puede hacerse siguiendo tres vías:

a) La primera correspondería a fijar ciertos parámetros con valores bien obtenidos según la bibliografía o con la realización de experimentos específicos. En el primer caso el procedimiento es aplicable a aquellos parámetros que han sido ampliamente estudiados. Su uso puede considerarse habitual en una primera fase de calibración, en la que pueden introducirse valores estándar de los parámetros para posteriormente modificarlos en función del ajuste obtenido.

La segunda posibilidad de fijar valores de parámetros puede proceder de determinaciones experimentales específicas que conduzcan a la obtención de algunos parámetros concretos. La utilización de esta metodología presenta como limitación que difícilmente es posible aislar fenómenos

b) La segunda vía de calibración corresponde a la utilización de correlaciones o relaciones experimentales. Esta posibilidad permite una mayor amplitud que la anterior ya que puede proporcionar el valor de los parámetros en función de las características variables del proceso, y por tanto permite simular un mayor número de condiciones.

c) El tercer mecanismo de calibración se basa en el uso de programas auxiliares de optimización que obtienen un conjunto de parámetros que minimizan el error cuadrático entre los valores obtenidos por simulación y los determinados experimentalmente. Si el problema que se plantea es de optimización sin restricciones, la mayoría de los métodos existentes son aplicables, especialmente aquellos que no requieren el uso de derivadas.

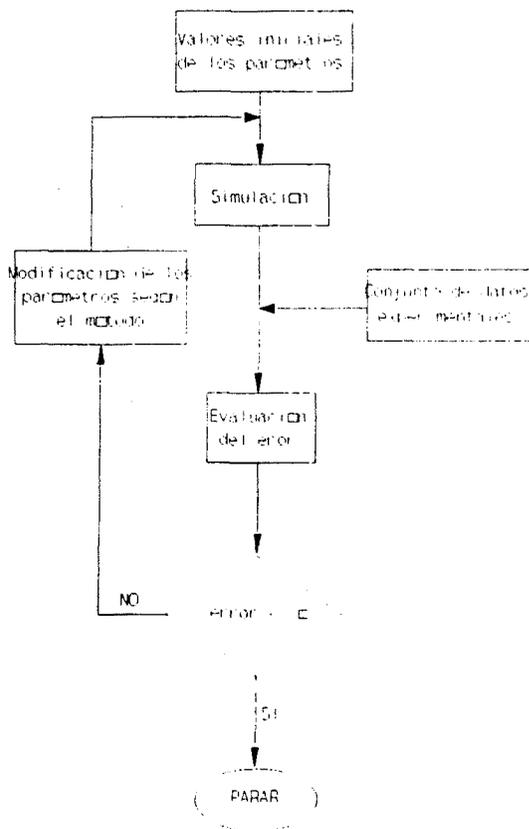


Figura 1.9.a. Proceso de calibración utilizando algoritmos de optimización acumulativos.

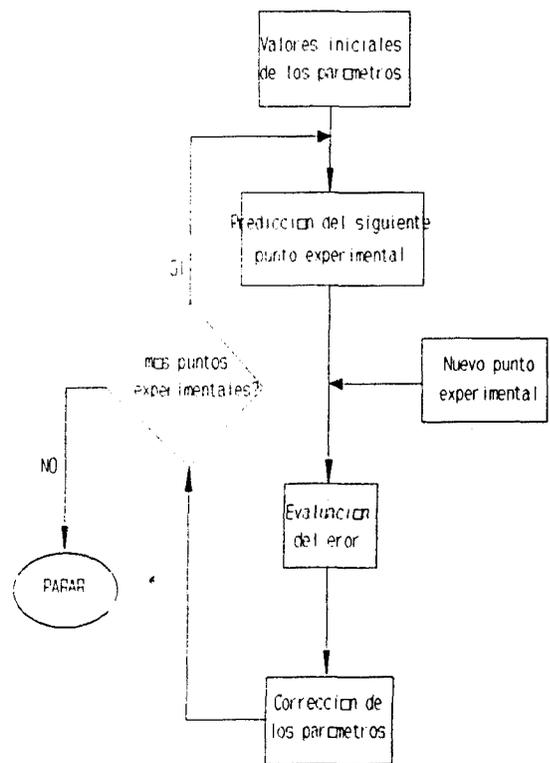


Figura 1.9.b. Proceso de calibración utilizando algoritmos de optimización recursivos

Una distinción a hacer correspondería a la utilización de métodos acumulativos o recursivos. En el primero de los casos el ajuste se realiza a partir del conjunto de datos experimentales, mientras que en el segundo, el ajuste se realiza progresivamente con la incorporación de cada nuevo dato experimental. Esta posibilidad permite, al menos de forma teórica, realizar el proceso de calibración en continuo y por tanto en caso de disponer de variables analizables en línea, ir mejorando el modelo de forma continuada y automática, lo cual le es especialmente recomendado para modelos dinámicos (figura 1.9.).

Como principal inconveniente de utilizar un algoritmo de optimización se encuentra la posibilidad de que al modificar conjuntamente todos los parámetros del modelo, en la solución final, si bien sea la que proporcione un mejor ajuste, los parámetros obtenidos no tengan sentido físico, químico, biológico... Este problema se incrementa de forma importante con el número de parámetros. Estas características han llevado a que estos métodos de optimización sean utilizados de forma más eficiente en el caso de modelos con pocos parámetros, mientras que en el caso de modelos con elevado número de parámetros se utilicen valores fijos en ciertas constantes, obtenidos de experimentos específicos de determinación directa de parámetros que son a priori independientemente calculados (Holmberg, 1982).

### *Validación.*

En el proceso de calibración los parámetros obtenidos habrán sido ajustados según unos datos experimentales, sin embargo ello no implica que con los mismos parámetros se simule correctamente una situación no incluida en la etapa de calibración. Al proceso de comparar los datos obtenidos mediante simulación, con nuevos datos experimentales se le denomina validación del modelo.

En esta etapa no es posible modificar los valores de los parámetros para obtener un mejor ajuste, ya que en dicho caso se podría deducir que el proceso de calibración del modelo ha sido incorrecto o que el modelo no es capaz de describir la situación.

Habría que tener en cuenta en esta etapa que las condiciones de trabajo correspondieran a unos valores en el rango en que se ha calibrado el modelo, ya que variaciones importantes no incluidas en el mismo pueden alterar el comportamiento de éste.

En todo caso habría que recordar que un modelo no puede ser nunca completamente validado, ya que no se podrá probar que describe la realidad en toda la amplitud de sus aspectos. Por ello, es recomendable que el proceso de calibración se realice en el mayor intervalo de trabajo posible.

### **1.5. Modelos de cinética microbiana. Tipos de modelos.**

Según las características del cultivo, los modelos pueden ser clasificados como segregados o corpusculares (Harder 1982) o distribuidos o continuos. Los primeros consideran que la vida está segregada en unidades estructurales y funcionales, las células, y por tanto la variable fundamental es el número de éstas. Los modelos distribuidos consideran que la vida está distribuida homogéneamente por todo el sistema; entonces, la variable fundamental es la concentración celular o cualquier otra medida relacionada con ella.

Los modelos pueden ser también estructurados o no estructurados. Los modelos no estructurados no tienen en cuenta ninguna estructura interna de las células: este tipo de modelos siempre expresa la concentración del microorganismo en términos de biomasa. Por otro lado, los modelos estructurados tienen en cuenta que la biomasa no es un compuesto simple, que dentro de las células se están llevando a cabo muchas reacciones entre miles de sustancias químicas. Este último tipo de modelos puede ser clasificado en tres grupos dependiendo del tipo de estructura que dentro de las células se está modelizando:

Modelos compartimentados: la biomasa se considera como un conjunto de compartimentos, los cuales son normalmente identificados con un grupo de macromoléculas tales como DNA, RNA, proteínas, etc.

Modelos metabólicos: este tipo de modelos estructurados consideran el metabolismo de la fuente de carbono dentro de las células, proponiendo ecuaciones cinéticas para las reacciones involucradas. El crecimiento se expresa en términos de biomasa, pero la producción y mantenimiento se describen de forma más detallada.

Modelos celulares o químicamente estructurados: estos modelos tienen también en cuenta el metabolismo de la fuente de nitrógeno dentro de las células, siendo esta la manera normal para estructural en material genético. De este modo el crecimiento sucede cuando el DNA es sintetizado. Cuando los modelos no estructurados no son capaces de explicar ciertas influencias de variables sobre sistemas microbianos, es necesario el desarrollo de modelos estructurados.

Finalmente, los modelos pueden ser estocásticos o probabilísticos y determinísticos, dependiendo de la naturaleza de las predicciones del modelo sobre el futuro del sistema. Un modelo determinístico permite, conocido el estado de sistema en un momento determinado, predecir con exactitud el futuro del mismo. Con un modelo probabilístico o estocástico se puede únicamente predecir la probabilidad de que el sistema se encontrará en determinada región, pero no se podrá definir exactamente su posición.

Los modelos pueden ser también parciales o globales, según tengan en cuenta algunas o todas las variables que intervienen en el sistema, y unificados o no, según que todas las fases del crecimiento se describan con una sola ecuación o se necesiten varias para describir completamente la curva de crecimiento.

Los modelos más ampliamente utilizados son los distribuidos y no estructurados, debido a su mayor simplicidad y a que permiten correlacionar los resultados experimentales de forma bastante satisfactoria. Entre ellos cabe destacar el de Monod (1942), que junto a las modificaciones introducidas para representar la energía de mantenimiento y los casos de inhibición, es el más utilizado.

### 1.6. Aplicaciones de la modelización. Control de biorreactores.

A pesar de que los enzimas son catalizadores más eficientes que los clásicos, los procesos enzimáticos, en general, todavía son más caros que los que se llevan a cabo con los catalizadores tradicionales (químicos). El principal problema es el poco conocimiento que se tiene de los procesos a utilizar. Los sistemas biológicos están regido por numerosas variables, todas con un efecto más o menos importante sobre la cinética y el rendimiento. Esto afecta mucho la repetitividad de la operación, ya que siempre hay parámetros que no han sido controlados porque no se sabe su influencia, cambiando de una fermentación a otra.

En general la obtención de datos que aporten información es una tarea difícil, accidentada y larga. Hay que resaltar también la poca fiabilidad y precisión de los datos en muchos casos (por ejemplo, la medida de viables si aparecen agregados, la medida de la absorbancia en medios con substratos no transparentes y variables con el tiempo, etc...)

Otro gran problema es la falta de instrumental analítico que permita conocer el valor y la evolución de las variables del proceso de manera suficientemente rápida, y a precios asequibles. Esto es fundamental en un proceso industrial para poder llevar a cabo un control que asegure los objetivos previstos.

Para resolver esta situación negativa se trabaja desde enfoques o aspectos diferentes dentro del campo de la biotecnología. Según Luyben (1990) y ordenados desde el nivel microscópico al macroscópico las líneas de actuación a profundizar son la ingeniería genética, metabólica, del reactor y de control.

La opción que actúa a nivel del fermentador permite mejorar los rendimientos en función de la operación del proceso. La utilización de procesos en discontinuo, semicontinuo o continuo, la aplicación de unidades de separación y purificación para obtener productos más puros, o el desarrollo de modos de operación donde se minimiza el efecto de inhibidores son aplicaciones resueltas o en estado de resolución por este enfoque. El diseño de reactores avanzados (lecho fijo, fluidizado, "air-lift", ...) también permite mejorar la operación.

A nivel de control la contribución interesante a la mejora de la biotecnología, es el diseño de un control optimizado y si es posible automatizado del proceso, contando además de la ayuda que representan algoritmos de identificación y estimación. Esta aproximación matemática necesita de un modelo del proceso para poder llevar a cabo cualquier objetivo.

El diseño de un sistema de control normalmente está basado en un modelo que resume el conocimiento relevante acerca del comportamiento del proceso. Hay dos alternativas principales a la hora de representar dicho conocimiento: por una parte, la modelización matemática clásica y por el otro, el enfoque de inteligencia artificial que proporciona un conocimiento básico, asociando una base de datos a través de reglas lógicas. A pesar de que se han hecho grandes avances en esta segunda

aproximación, la modelización matemática clásica, sigue siendo, por el momento, la metodología más eficiente y fidedigna para utilizar estos conocimientos sobre el proceso y diseñar sistemas de control.

Así pues, para poder abordar el control de un proceso determinado, se necesita de un modelo de funcionamiento del mismo que se plasma en un conjunto de ecuaciones que relacionan las variables del sistema, de manera que la solución de estas ecuaciones describe su comportamiento. De esta forma, a partir de lo que se sabe del sistema, se formulan unas hipótesis que pretenden explicar lo que se observa.

## **1.7. Instrumentación y medida en procesos biotecnológicos.**

### **1.7.1. Instrumentación.**

El control de bioprocesos se basa en modelos matemáticos que describen la interacción entre el "ambiente" de la célula y su metabolismo. La eficacia del modelo y la descripción del bioproceso depende mayoritariamente del número y la precisión de los parámetros físico-químicos que pueden ser monitorizados. También es importante disponer de una buena instrumentación para realizar correctamente la etapa de escalado, la estandarización de la calidad del producto, el conocimiento del comportamiento aerodinámico del proceso, y la reducción de costos de materiales y de operación.

La implementación de una buena instrumentación en los procesos biotecnológicos tiene como objetivos finales el aumento de la productividad de los bioreactores, el control óptimo de las reacciones que se producen y mejoras en la producción de las diversas cepas y del diseño de bioreactores. Si bien para la medida de algunos parámetros la instrumentación usada en procesos biotecnológicos es semejante a la de procesos químicos convencionales es necesario que cumplan los siguientes requisitos:

- Las sondas tienen que poder resistir procesos de esterilización, preferentemente con vapor (1,2 atm., 121°C).
- Tienen que poder ser usada en medios de turbidez acusada.
- Insensibilidad a la adsorción de proteínas y al crecimiento celular sobre ellas o bien estar protegidas para evitar estos fenómenos.
- Alta resistencia a fuerzas mecánicas y a posibles erosiones por parte de partículas sólidas.
- Estabilidad, por ejemplo con respecto a la descomposición enzimática.
- Especificidad respecto al parámetro que se desea medir.

Con estas premisas los procedimientos de instrumentación pueden clasificarse en función de como y donde se realiza la medida en:

**Off-line.** Implica la toma de muestra y el posterior tratamiento y análisis de la misma por parte del investigador. Se utilizan métodos químicos y microbiológicos tradicionales, presentando, generalmente, elevados períodos de respuesta (horas, días) y por consiguiente inaplicables para el propósito de control.

**On-line.** La instrumentación automática se encuentra fuera del bioreactor, necesitará un equipo de toma de muestras que proporcione una corriente libre o no de biomasa y que mantenga las condiciones de esterilidad, y un posterior equipo automático analítico que proporcione la medida en un período de tiempo corto.

**In-line.** El elemento analítico se encuentra en el interior del fermentador en contacto con el medio de cultivo. Se evitan problemas de retardo o representatividad de la muestra.

Otra posible clasificación es función de los parámetros o propiedades físico-químicas a analizar:

Parámetros físicos.

Parámetros químicos.

Propiedades hidrodinámicas.

Análisis de sustratos y productos.

Biomasa y características celulares.

#### ***Parámetros físicos:***

**Temperatura.** Parámetro importante para controlar la temperatura óptima del cultivo y procesos auxiliares como la etapa de esterilización. También puede permitir la realización de balances de energía proporcionando información adicional del estado de la fermentación.

Los termómetros tipo mercurio se utilizan únicamente como aparatos de comprobación, siendo los sensores más utilizados en orden creciente de precisión los termopares, las resistencias de platino y los termistores.

**Presión.** La importancia de su medida radica en el hecho de que una variación de presión afecta a la solubilidad de los gases presentes ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) y de ciertas sustancias volátiles (Etanol). La existencia de una pequeña sobrepresión en el interior del fermentador contribuye a favorecer las condiciones de esterilidad del mismo y finalmente puede ser un indicativo de problemas de operación como saturación de filtros de salida.

Si la medida se realiza en zona estéril los equipos Bourdon son los más utilizados, mientras que cuando se requieren condiciones de esterilidad los transductores de presión protegidos por diafragmas y los mismos diafragmas son los más utilizados.

**Agitación.** Parámetro que generalmente se mide fuera de la zona de esterilización mediante sensores ópticos o magnéticos si los equipos son pequeños y mediante tacómetros si se trata de grandes equipos. El problema de su medida se encuentra totalmente solucionado, no tanto si se quiere emplear esta medida para conocer la cantidad de energía aportada por el sistema de agitación al fluido, puesto que si bien tradicionalmente se ha utilizado como criterio el consumo de energía asociado al motor, ésta es una medida inexacta pues no tiene en cuenta la pérdida de potencia en los diferentes sistemas de transmisión y que pueden llegar a suponer el 30% de la energía total aportada.

**Espumas.** La formación de espumas puede llegar a ser un grave problema sobre todo en aquellos sistemas fermentativos en que el aporte externo de gases (aire,  $\text{O}_2$ ) es importante. Se detecta mediante una sonda cuya capacitancia o conductividad varía al entrar en contacto con la espuma.

Los antiespumantes pueden ser mecánicos, sistemas de discos o configuraciones particulares que rompen la espuma y no afectan al medio de fermentación, o agentes químicos, derivados de la silicona o polialcoholes, y que pueden afectar al medio fermentativo, de hecho un efecto común es la disminución del coeficiente de transferencia de oxígeno.

**Medidores de caudal.** Para la determinación de caudales de gases los más utilizados son los medidores de área variable tipo rotámetro, tienen el problema de no ofrecer señal eléctrica de salida. Si además se quieren realizar balances los más indicados son los medidores de caudal térmicos (másicos), con tiempos de respuesta bajo, con señal eléctrica e independientes de la presión y la temperatura.

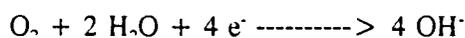
Para la determinación de caudales de líquidos no son recomendables aparatos que realicen la medida in-line como rotámetros o estrechamientos, utilizándose más comúnmente medidores

magnéticos, por pesada, bombas de desplazamiento positivo, jeringas automáticas o bombas peristálticas.

### *Parámetros químicos*

**pH.** Instrumento comercial la medida del cual se basa en el valor del potencial eléctrico que pasa a través de una membrana. La calibración se tiene que realizar previa a la esterilización, el electrodo se sitúa en el interior de una carcasa con sobrepresión para evitar que el líquido del medio de cultivo entre en el interior y se mezcle con el electrolito (KCl 3M.). Tiene un tiempo de vida limitado en función del número de esterilizaciones que se realizan y del medio de fermentación.

**pO<sub>2</sub>.** Los actuales se basan en reacciones electroquímicas. Generalmente son amperimétricos bien sea polarográficos o galvánicos. En el primero la fuerza impulsora es aportada por una fuente externa, en el segundo está creada por la propia célula electroquímica. Los más utilizados son polarográficos. Entre el cátodo (Pt) y el ánodo (Ag) ambos inmersos en una solución electrolítica se suministra un voltaje de forma que el oxígeno disuelto se reduce según:



produciéndose simultáneamente la oxidación de la plata en el ánodo:



Téngase en cuenta que analizan la presión parcial y no la concentración de oxígeno disuelto.

**CO<sub>2</sub> Disuelto.** Es uno de los productos finales de la oxidación completa de sustratos por parte de los microorganismos, pudiendo afectar su nivel de concentración al metabolismo celular, es un parámetro interesante de conocer. Se basa en la medida del pH siguiendo la reacción de equilibrio de disolución del ácido carbónico. Siendo la concentración de CO<sub>2</sub> proporcional a la de protones.

**Potencial redox.** Aunque disponibles presentan dificultades en la interpretación de sus resultados. Parece establecido que el potencial redox en fermentaciones aeróbeas está íntimamente relacionado con el oxígeno disuelto. No obstante téngase en cuenta que miden el potencial redox del medio de

cultivo y no el del interior de la célula. Se utilizarán específicamente para estimar formaciones de productos y cambios de metabolismo en aquellas zonas por debajo de los límites de las sondas de oxígeno disuelto convencionales.

#### *Análisis de gases de salida.*

Los gases de salida de un fermentador más comúnmente analizados debido a la gran información que proporcionan son el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>. Si bien debido a su probada fiabilidad y relativo bajo coste el analizador paramagnético (O<sub>2</sub>) y el infrarrojo (CO<sub>2</sub>) son los más utilizados está cobrando auge la espectrometría de masas a medida que empieza a ser utilizada en procesos industriales, como detector de cualquier especie química, proporciona la posibilidad de analizar además los componentes volátiles del medio de cultivo, puede operar durante largos períodos de tiempo y se encuentra totalmente automatizado, su precio no obstante es del orden de cinco veces superior al de los analizadores convencionales.

Sus principales aplicaciones son la determinación del balance de gases (OUR), (CER). El análisis de volátiles en la fase líquida, ya sean gases disueltos o compuestos orgánicos tipo alcoholes, ésteres, aldehidos.... Detección de compuestos volátiles en fase líquida en fermentaciones complejas. Pirólisis previa de muestras fermentativas.

El equipo tiene la necesidad de crear un alta vacío del orden de 10<sup>-5</sup> mbar. lo cual se consigue mediante una bomba rotatoria y otra turbomolecular. La introducción de la mezcla es realizada por medio de un capilar que deriva continuamente un caudal de la corriente de gases de salida del fermentador. La ionización se produce mediante el impacto de electrones lo que produce la fragmentación molecular. La separación de estos fragmentos se produce en un filtro cuadrupolar (por acción, generalmente, de un campo magnético), detectándose mediante un equipo Faraday o por medio de un multiplicador secundario de electrones (SEM).

El análisis de muestras volátiles requiere una mayor etapa de calibración, puesto que éste puede depender de la solubilidad y difusividad a través de la membrana y de las conducciones, pudiendo causar un enriquecimiento de algunos compuestos en detrimento de otros.

### *Propiedades hidrodinámicas.*

Otras características en sistemas multifásicos cuyo conocimiento puede ser importante son las reológicas. Bajo este término se agrupan parámetros como velocidad media, turbulencia en la fase continua, distribución de tamaño de burbuja, velocidad de la fase dispersa, hold up, mezcla de fases y transferencia de materia entre ellas. La mayoría de estos parámetros solo pueden ser medidos in-situ. Todas estas medidas permiten determinar la influencia de las variaciones de la biomasa. La morfología celular y la reología del medio. Si se conocen las relaciones de estos parámetros cualquiera de los métodos se puede analizar con el propósito de control.

Los equipos utilizados para estas determinaciones son los Laser doppler anemometers, que se basan en la propiedad de la luz laser de coherencia espacial y temporal para medir la velocidad de cambio de la fase (frecuencia) después de la dispersión producida en la luz por efecto de las pequeñas partículas en movimiento en el seno del fluido, siendo la medida proporcional a la velocidad de las partículas, y los hot film anemometers que hacen uso de la pérdida de calor en un sensor que es una resistencia calorífica para medir velocidades locales de fluidos.

### *Análisis de substratos y productos.*

Entre las técnicas o instrumentación más aplicada en análisis de substratos y productos se encuentran los siguientes:

- Biosensores
- Autoanalizadores.
- Análisis por inyección en flujo (FIA).
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
- Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).
- Cromatografía de Intercambio iónico.
- Cromatografía de gases (GC).
- Análisis inmunológico por inyección en flujo (FIIA).

### **Biosensores**

Un Biosensor es una unidad analítica compuesta por una "bio"-parte y un transductor. La biopartícula es generalmente un enzima (pudiendo ser biomoléculas o microorganismos), el enzima se escoge en función de su especificidad por el sustrato o producto, estando generalmente inmovilizado. El producto de la reacción es detectado por un sensor específico que puede ser luz-fibra óptica, calor-termistor, variación de pH-pHmetro, producción de  $O_2$ - $pO_2$ . Este sistema que parece tener un potencial de aplicación sin límites está sufriendo una intensa investigación para solucionar los problemas de aplicación que presentan. Los principales son: la falta de estabilidad, la falta de reproducibilidad (calibraciones), falta de robustez, falta de enzimas específicos y ser un monoanalizador.

### **Analizadores automáticos**

Son equipos enzimáticos o químicos automáticos empleados en análisis de rutina. Sus principales problemas son el posible crecimiento de microorganismos (se evita con azida sódica), limpieza regular para separar sedimentos o capas de proteínas, calibraciones, diluciones y blancos. Ejemplos de parámetros determinados por estos métodos son: fosfatos, sulfatos, urea, penicilina, carbónico orgánico disuelto, azúcares reductores y metionina.

### **FIA**

El análisis por Inyección en flujo es una modalidad del análisis en flujo continuo caracterizada por que el flujo es no segmentado, una inyección directa de la muestra, dispersión parcial controlada y tiempo de operación reproducibles, sus principales ventajas son la reducción del tiempo de análisis, la gran reproducibilidad de sus resultados y su pequeño volumen de muestra requerido, del orden de decenas o cientos de microlitros.

### **HPLC**

Se basa en la separación de los componentes de una muestra dentro de una columna mediante fenómenos diversos (adsorción, cromatografía de gel, cromatografía de afinidad, repartición líquido-líquido ...) y la posterior detección. Si bien es un equipo que utilizado para análisis off-line se conocen un sinnúmero de aplicaciones, su automatización en procesos biotecnológicos se encuentran

bastante reducidas. (antibióticos y sus precursores, etanol, algunos azúcares, lactato, glicerol y aminoácidos.

### **FPLC**

Debido a problemas tecnológicos (acondicionamiento de muestras y condiciones de trabajo), así como a problemas de selectividad y sensibilidad es raramente empleado on-line para la monitorización de procesos de producción de proteínas. No obstante las empresas Rhone-Poulenc Sante y Pharmacia tienen procesos controlados en línea por FPLC.

### **Cromatografía de Intercambio iónico**

Se basa en tres diferentes técnicas de separación: intercambio iónico (HPIC), exclusión iónica (HPICE) y formación de pares iónicos (MPIC). El detector de conductividad plantea las principales dificultades del método en cultivos de alta fuerza iónica y/o alto contenido en proteínas. La derivatización de los componentes y el uso de fotómetros como detectores son métodos que solucionarían estos problemas. Concentraciones elevadas de proteínas pueden provocar el taponamiento de la columna, su solución pasa por la desproteinización del medio de cultivo.

### **Cromatografía de gases**

Para composiciones de gases complejas es preferible al espectrómetro de masas, particularmente cuando los reactantes y productos tienen el mismo tipo de división.

### **Análisis inmunológico por inyección en flujo**

El análisis automático de sustancias de alto peso molecular o proteínas se encuentra menos desarrollado que el análisis de sustancias de bajo peso molecular como sustratos y metabolitos. EL análisis en tiempo real de la concentración o estabilidad de estos productos se presenta actualmente como uno de los campos punta de investigación. El poder discriminatorio de los anticuerpos ha hecho del inmunoensayo el principal candidato para este tipo de detección, debido a que es una reacción altamente específica, su preparación no es muy compleja y prácticamente existen para cualquier tipo de proteínas. El principio del FIA es especialmente importante para la automatización de las

reacciones antígeno-anticuerpo, dando lugar al FIIA. Así uno de los claros ejemplos de aplicación sería la automatización de los ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

### *Biomasa y características celulares.*

El otro parámetro cuyo conocimiento es básico en los procesos biotecnológicos es el estado del microorganismo. Actualmente el análisis automático empleado de rutina en la determinación de la concentración celular es la medida de la densidad óptica del cultivo, sin embargo esta medida proporciona información parcial del microorganismo no dando indicación ninguna de cual es el estado celular del mismo. Los métodos utilizados se basan en métodos ópticos, polarográficos o densitometrías de resonancia acústica.

Más información proporciona el análisis del NADH de la célula mediante microfluorimetría. Esta medida es usada como un indicador de la actividad celular. En combinación con el método anterior permitiría diferenciar entre biomasa activa e inactiva. La relación  $NAD^+/NADH$  es un relación celular clave, pues es sensible a cambios ambientales como procesos de inhibición por sustrato, limitaciones de oxígeno o variaciones de la velocidad de dilución. El NADH es un importante portador REDOX del metabolismo celular, su concentración es un índice de la energía asociada a la célula y su actividad metabólica. La medida se basa en la propiedad del NADH de fluorescer a 460 nm. cuando es excitado a 340 nm., siempre que la fluorescencia del medio de cultivo sea baja. Su principal limitación, la compleja instrumentación necesaria, se está superando rápidamente existiendo actualmente sondas comerciales.

Un equipo mucho más completo en función de la información que puede proporcionar sobre el estado celular es el citómetro de flujo. El método consiste en conseguir la alineación de las células de una en una a través de un haz de luz incidente. La luz que se dispersa proporciona información sobre el tamaño y morfología celular. Si además estas células se encuentran marcadas con sustancias, "sondas", fluorocrómicas de manera que se produzca una emisión de fluorescencia se puede tener conocimiento sobre parámetros tales como niveles de ácidos nucleicos, anticuerpos, lecitinas, pH intracelular, integridad de membrana o actividad enzimática. Otros métodos que empiezan a tomar auge se basan en principios microcalorimétricos o en termistores enzimáticos.

### *Equipos de toma de muestras*

Sin tener soluciones a este problema la mayoría de los métodos analíticos presentados no tendrían ninguna aplicación. Las dos funciones básicas del equipo de toma de muestras son el transporte de la solución que contiene el analito a analizar hasta el sensor y el mantenimiento de las condiciones de esterilidad. En procesos con células inmobilizadas, o en aquellos en que la biomasa no interfiere el análisis su tratamiento es más sencillo puesto que no se tiene que separar la biomasa, pero generalmente la determinación de substratos, productos y otros componentes químicos del cultivo viene precedido de la condición de que se encuentren exentos de biomasa. Los problemas que presenta el no eliminar la corriente de biomasa son: La no parada de las reacciones biológicas, que en el caso de crecimientos bacterianos pueden ser fuente de errores importantes. Interacciones biomasa-reactivos o biomasa-transductores. Problemas de adsorción de la misma al equipo analítico. Presencia de volúmenes muertos y retromezcla.

Cuando no se puede trabajar con muestras estériles una manera de evitar las reacciones biológicas es usando un inhibidor metabólico celular que, posteriormente, es eliminado a la hora del análisis. Los equipos de toma de muestras atendiendo al tamaño de molécula a separar se clasifican en equipos de ultrafiltración, microfiltración y diálisis. Mientras que en función de donde se produce la eliminación de la biomasa en: in-line cuando el equipo se encuentra dentro del fermentador siendo la biomasa eliminada por la propia agitación del medio o por la rotación del propio equipo, con objeto de evitar la colmatación de la membrana.

On-line cuando la biomasa es eliminada en un bucle exterior, haciendo circular la solución a través de equipos comerciales tipo BIOPEM™, o MINITAN™ de Millipore.

#### **1.7.2. Procesamiento de señal.**

En la obtención de señales, tendremos a parte de la información que interesa otras componentes de la señal indeseables. Como consecuencia de ello, la señal analítica adquirida se puede considerar una señal en bruto que raramente puede utilizarse de forma directa. Por tanto, resulta evidente que en muchísimas ocasiones será necesario procesar la señal obtenida en orden a separar o minimizar el efecto de los componentes ajenos a la información buscada. Este

procesamiento mejora la exactitud y precisión de los resultados a la vez que suele facilitar la interpretación de los mismos, y con ello, el paso desde resultados a información.

Sin embargo, es necesario considerar cuál es el origen de esos componentes ajenos a la información buscada en la señal. En el caso ideal, debería existir una relación causa-efecto unívoca entre la presencia y concentración de un determinado componente y la amplitud de la señal analítica obtenida. En este caso, la señal resultaría específica del componente. No obstante, casi nunca es este tipo de situación la que se encuentra. Por el contrario, la situación normal es aquella donde se aprecia que una misma causa puede producir varios efectos pero, que un mismo efecto puede ser el resultado de diversas causas. Habitualmente se denomina interferencias a este tipo de efectos y existen múltiples vías para abordar este problema. En cualquier caso, además, la señal analítica conlleva componentes que se denominan ruido, procedentes de todas y cada una de las partes o elementos del sistema analítico. Esta componente está presente en la señal incluso para relaciones estrictamente específicas y por tanto se puede tratar el problema desde un punto de vista general.

Por tanto, se puede entender el procesado de datos en bruto como un proceso en el que:

a) Se trata de eliminar o minimizar las componentes no esenciales (ruido, componentes irrelevantes o que no contienen información) de la señal analítica.

Para ello, en ocasiones resulta necesario someter la señal a algún tipo de transformación. En consecuencia, cuando el objetivo anterior ha sido alcanzado.

b) Se ha de reconstruir (invertir la transformación realizada) los datos esenciales, al objeto de disponer nuevamente de una señal fácil y eficazmente interpretable.

En otros casos, la propia transformación facilita la interpretación (por ejemplo, la derivación de señales) pero, frecuentemente, solo pueden obtenerse los beneficios previstos de dicha transformación si las componentes de ruido de la señal han sido previamente eliminadas o minimizadas. Por tanto, la operación de limpieza o filtrado de la señal resulta una necesidad habitual en las etapas finales del proceso analítico.

### *Caracterización del ruido.*

Asociados con las señales de utilidad en análisis, suelen presentarse tres tipos básicos de ruido. Estos tipos pueden ser clasificados en base a su espectro de frecuencias.

**RUIDO BLANCO.** Tiene un espectro de frecuencia plano y resulta provocado por procesos aleatorios (movimiento browniano, influencias externas y movimiento térmico de los electrones-Ruido Johnson o de Resistencia-,etc.) y resulta característico de procesos en los que el ruido producido por el detector resulta ser la componente dominante. Este ruido tiene una amplitud independiente de la amplitud de señal, resulta aditivo a la misma y se puede describir su distribución de probabilidad mediante una gaussiana. En determinados procesos de medida, no obstante, la distribución de probabilidad no es gaussiana sino de tipo Poisson (contaje de partículas, procesos radioactivos, rayos-X, contaje de fotones, etc.) y presenta la característica de que para este ruido la media cuadrática de la amplitud del ruido es proporcional a la raíz cuadrada de la amplitud de la señal-shot noise-.

Existen casos además, en los que la distribución de probabilidad del ruido no obedece una gaussiana o una distribución de Poisson (por ejemplo, la corriente oscura de los fotomultiplicadores).

**RUIDO 1/f.** Es un ruido típicamente asociado a amplificadores de corriente y que se manifiesta en forma de deriva de la señal. Resulta proporcional a la frecuencia y por tanto caben dos posibilidades generales:

Ruido Rojo. Cuando la amplitud del ruido de baja frecuencia es superior al valor promedio.

Ruido Azul. Cuando la amplitud del ruido de alta frecuencia es superior al valor promedio.

**RUIDO DE INTERFERENCIA.** Proviene generalmente de fuentes externas con poca probabilidad de que ocurra (interruptores, pulsos, etc.)

En la práctica, todos los tipos de ruido aparecen conjuntamente y producen una mezcla que se adiciona a la señal. Resulta evidente al considerar los tipos de ruido que una eliminación completa del mismo resulta materialmente imposible. Además inevitablemente, los dispositivos utilizados para la eliminación del ruido introducen a su vez ruido.

Además, tiene poco sentido hablar en términos absolutos de la señal o del ruido, puesto que la posibilidad de diferenciar una del otro depende de sus amplitudes relativas. Por tanto, conviene

definir una relación entre ambas que mediante una sola magnitud permita saber cuando la señal podrá ser medida e interpretada de forma apropiada y cuando no. Dicha relación se conoce como relación señal:ruido (S/N) y se define habitualmente como:

$$S/N = ( Y_s - Y_o ) / \text{desv. est. fondo}$$

siendo  $Y_s$  el valor medio de la señal e  $Y_o$  el valor medio del fondo. Evidentemente, esta magnitud es mucho más útil desde un punto de vista práctico, puesto que la posibilidad real o no de discriminar la señal depende de su valor y no de los valores absolutos de ella y el fondo. En consecuencia, el objetivo de las técnicas que se van a describir es precisamente la mejora o incremento de esta relación.

### *Tipo de Filtros.*

En general, la operación de reducción del ruido asociado a la señal o de mejora de la relación S/N se conoce como filtrado y las técnicas que sirven este objetivo, como filtros.

Todos los filtros operan sobre frecuencias aunque, algunos de ellos ejecutan en dominio de frecuencias y otros en dominio de tiempo. Por otra parte, algunos filtros actúan sobre la señal cuando esta es continua (el voltaje de salida del transductor o su electrónica asociada) mientras que otros actúan sobre datos digitalizados (discontinuos). En el primer caso se denominan filtros analógicos, mientras que en el segundo se habla de filtros digitales. Es necesario hacer notar que la diferencia entre ambos no se refiere al hecho de que unos actúen en la electrónica de los instrumentos (lo cual suele ser una creencia demasiado extendida), mientras que los otros actúan sobre datos recogidos en ficheros de ordenador mediante una interfase del tipo convertidor analógico/digital. De hecho, todas las técnicas analíticas basadas en fenómenos de contaje (rayos-X, espectrometría gamma, etc.) producen directamente señales digitales y, por tanto el filtrado de tales señales debe ser de tipo digital.

En el momento actual, la inmensa mayor parte de las veces se trabaja sobre datos que han sido transferidos desde los instrumentos de medida hasta un ordenador a través de una interfase adecuada. Dichos datos son almacenados en la memoria (real o másica) del ordenador y pueden ser procesados a posteriori (off-line) o bien, en tiempo real (on-line) si el ordenador dispone de la capacidad de procesamiento multitarea o si el software de adquisición ha sido estructurado para trabajar en modo "foreground-background". Quizá por esta razón, se suele prestar mucha más

atención a los filtros digitales que los analógicos. Además, un conocimiento medianamente profundo de estos últimos requiere algunos conocimientos de electrónica, mientras que los filtros digitales son algorítmicos y su matemática en muchos casos es bastante sencilla. No obstante, muchos de los conceptos que se aplican en el filtrado de señales proceden del filtrado analógico, así como buena parte de la terminología.

### Filtros analógicos

En primer lugar se pueden encontrar los filtros llamados de paso-bajo, que permiten el paso de frecuencias bajas mientras cortan (amortiguan la amplitud), el paso de frecuencias altas. Cuando se implementa este control, se está definiendo la proporción en la que son amortiguadas las frecuencias y a partir de que rango de frecuencias la amortiguación será efectiva.

Del mismo modo, se pueden encontrar en los registros o instrumentos derivas más o menos importantes. Se trata igualmente de ruido, pero en este caso, con una frecuencia menor que la propia de la señal de interés. No siempre es posible eliminar este tipo de ruido electrónicamente pero, en general el ruido de baja frecuencia se elimina con un filtro de paso-alto.

Además, resulta lógico admitir que algunas señales vienen acompañadas de ruido de mayor frecuencia que ellas mismas y también de ruido con menor frecuencia. Un filtro para este tipo de señales se denomina de paso-banda. En el caso contrario, puede ser que interese la componente de alta frecuencia y también la de baja frecuencia pero las componentes de frecuencia intermedia sean ruido. Su eliminación implica la utilización de un filtro de corte que permita el paso de todas las frecuencias excepto aquellas comprendidas en un rango estrecho determinado.

Desde el punto de vista de la electrónica, los componentes esenciales de los filtros analógicos simples son resistores y capacitores. La resistencia de un resistor (definida por la ley de Ohm) debe ser idealmente una constante y resultar invariante a la frecuencia, la impedancia del resistor (resistencia dependiente de la frecuencia) es igual a su resistencia. Un capacitor también tiene la propiedad de resistir o impedir el paso de la corriente eléctrica, pero la extensión de esta propiedad depende de la frecuencia de la señal.

Un filtro sencillo incluye solamente un resistor y un capacitor en paralelo o en serie, teniendo dos efectos en la señal:

- 1) Disminuye la amplitud de un rango particular de frecuencias (por ejemplo un filtro de paso-bajo disminuye la amplitud de las frecuencias altas, aumentando la atenuación al aumentar la frecuencia).
- 2) Provoca un desfase (por ejemplo, si una onda coseno simple se somete a un filtro de paso-bajo, aparece una señal retrasada con respecto a la de entrada; lo mismo ocurre con picos y las ondas cuadradas se tornan redondeadas).

En el caso ideal, el filtro debería hacer cero las frecuencias elevadas (aquellas situadas por encima de su corte y transmitir plenamente las frecuencias inferiores al corte. Sin embargo, los filtros, no se comportan de manera ideal. Por tanto, los filtros plantean dos problemas, uno de ellos es su imperfección respecto a un comportamiento ideal y el otro es la introducción de un desfase en la señal.

#### **Filtros de paso bajo.**

Este tipo de filtros están casi inevitablemente presentes en la circuitería analógica de la interfase al computador, y ello por dos razones:

- 1) El amplificador no puede responder con velocidad infinita.
- 2) El filtro se incluye intencionadamente para eliminar algo de ruido.

Cuando el filtro incluye solamente un elemento RC (resistor-capacitor) el filtro se denomina de etapa sencilla. La respuesta de este filtro se puede representar según un Diagrama de Bode. En estos diagramas la respuesta a la frecuencia en función de la frecuencia se representa en una escala doble logarítmica. En este tipo de filtros la ganancia se mantiene relativamente constante para bajas frecuencias pero disminuye casi linealmente para altas frecuencias.

La frecuencia de corte superior ( $f_c$ ) se define como aquella frecuencia a la cual el filtro atenúa la amplitud por un factor de 0.707 (-3 dB).

La otra característica de estos filtros es el desfase. El ángulo de desfase de la señal respecto a la original debida al filtro es:  $\phi = \arctan(X_c / R) - 90^\circ = \arctan(6.28 f R C) - 90^\circ$ , por tanto, al aumentar la frecuencia también aumenta el ángulo de desfase y para  $f_c$  este ángulo es de  $45^\circ$ .

Los filtros descritos hasta el momento se denominan de paso-bajo de primer orden. Un filtro de paso bajo debe tener un corte con mucha mayor pendiente que lo visto para aproximarse a un comportamiento ideal. Pueden implementarse filtros de orden superior montando en cascada filtros de primer y segundo orden y, por supuesto, actualmente existen filtros mucho más sofisticados (electrónicamente hablando) que se aproximan bastante al comportamiento ideal.

### **Filtros de paso alto.**

Se utilizan para eliminar un cierto nivel de señal de una señal de alta frecuencia. Típicamente se usan en señales que han debido ser moduladas. El esquema es el mismo que para los filtros de paso-bajo excepto que, lógicamente los elementos tienen situaciones contrarias en el esquema del montaje. Nuevamente, el diagrama de Bode será útil para apreciar su funcionamiento y podrá definirse una frecuencia de corte inferior  $f_c$  en la que la ganancia será atenuada -3 dB y en el que el desfase será  $45^\circ$ .

Como en el caso de los filtros de paso-bajo también existen filtros de orden superior cuyo funcionamiento se aproxima mejor a la idealidad que los filtros simples RC.

### **Filtros de paso de banda y de corte.**

Estos filtros se consiguen por solapamiento de filtros de paso-bajo y filtros de paso-alto. En el caso del filtro de banda, se define una frecuencia  $f_c$  utilizándose un filtro de paso-bajo con  $f_2 \geq f_c$  que se superpone a un filtro de paso-alto con  $f_1 \leq f_c$ . Contrariamente, un filtro de tajo se construye asociando un filtro de paso-bajo con  $f_2 \leq f_c$  a un filtro de paso-alto con  $f_1 \geq f_c$ .

### Filtros digitales

Como ya se ha descrito anteriormente, los filtros son aplicables sobre señales intrínsecamente digitales o que han sido digitalizadas por efecto de su adquisición a un computador. Normalmente,

el proceso de filtrado digital implica una transformación de los datos originales. La señal filtrada es una transformada de la señal original. Consecuentemente se necesita conocer la naturaleza de la señal original y cual es el efecto producido por la transformación para poder interpretar adecuadamente los datos de salida. De lo contrario es relativamente fácil introducir artefactos en los resultados.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que en un proceso de digitalización de cualquier señal, lo que se obtiene es una muestra de la señal y no toda. Como en cualquier proceso de muestreo, resulta esencial garantizar que la información presente en la muestra es precisamente aquella que se busca en la población muestreada. Sin embargo, el muestreo de una señal analítica para digitalización no es nunca aleatorio, sino que se obtienen muestras sistemáticas a intervalos regulares de tiempo. Si se supone que en el proceso de transmisión de los datos los errores no son significativos, cada muestra (dato) será:  $Y_i = y_i + r_i$  donde  $y_i$  es el verdadero valor de la magnitud y  $r_i$  la componente de ruido asociada a ese punto en el preciso momento en el que la muestra ha sido tomada. Por tanto, el proceso de adquisición y digitalización de la señal puede introducir dificultades a la hora de interpretar la señal una vez adquirida. Un efecto bien conocido en técnicas de adquisición de datos es el denominado de camuflaje y que tiene lugar siempre que la frecuencia de muestro se sitúa por debajo del denominado Límite de Niquist. El teorema de Niquist establece que solamente es posible reproducir correctamente la frecuencia de una señal cuando esta se muestrea a frecuencia doble (o mayor del doble) de la que presenta la señal.

En este tipo de situaciones, el error en la interpretación de la señal ni tiene nada que ver con el ruido asociado a la misma y es inherente al propio proceso de muestreo. Puesto que en la práctica se dispone únicamente de la señal adquirida (digitalizada) y no de la señal original analógica, este tipo de problema no tiene solución a posteriori y debe ser previsto antes de efectuar la adquisición.

No obstante, resulta posible que se haya previsto el efecto de camuflaje para la señal de interés y, sin embargo, el camuflaje del ruido provoque errores en la interpretación. Puede suceder que la velocidad de muestreo sea suficiente para muestrear correctamente la señal pero no para muestrear correctamente el ruido. La componente de ruido aparece en la señal reconstruida como si tuviera una frecuencia mucho menor que la que realmente presenta.

Este tipo de problemas tiene dos soluciones posibles:

- 1) Muestrear a suficiente velocidad como para garantizar que el ruido es también correctamente muestreado (frecuencia de muestreo superior al límite de Niquist para la componente de frecuencia más alta del ruido) y después, filtrar digitalmente el ruido.
- 2) Utilizar un filtro analógico previo al convertidor analógico-digital encargado de eliminar el ruido de alta frecuencia que de esta forma ya no será muestreado (filtro anti-camuflaje).

De las dos opciones, la segunda resulta no solamente más lógica sino también mucho más práctica. Evidentemente, es difícil saber cual es la componente de frecuencia más alta del ruido en casos prácticos y además, muestreando a tal frecuencia la memoria consumida para almacenar la señal será muy grande. Debido a que los convertidores no trabajan a velocidades infinitamente grandes, un aumento en la velocidad de adquisición implica un sacrificio en la resolución del convertidor que, normalmente no es aceptable con fines analíticos.

#### **Técnica del promediado de señales**

Es el método más simple y clásico de filtrado de señales. En este caso, se asume que el ruido tiene un carácter fundamentalmente aleatorio y que por tanto, la componente del ruido oscilará por encima y por debajo de un cierto nivel promedio adicionándose a la señal de interés. Si se mide repetitivamente la señal, cuando el número de mediciones es elevado (en teoría es plenamente cierto para un número infinito de mediciones) las desviaciones positivas compensarán las desviaciones negativas de modo que el ruido desaparecerá (será cero o un "offset," constante).

De acuerdo con esto, el procedimiento es realmente sencillo y consistirá en adquirir repetitivamente la señal un gran número de veces, sumando cada nueva adquisición a la resultante de barridos anteriores y, finalmente, dividir la suma total por el número de adquisiciones efectuadas. El resultado obtenido depende del número de barridos o lecturas realizadas, y lógicamente, deben tomarse algunas precauciones y la señal analítica debe cumplir ciertas condiciones:

- a) Debe ser reproducible, puesto que se deben de hacer mediciones (barridos) repetitivos.
- b) Se necesita un punto de referencia consistente para iniciar cada nuevo barrido.

Puesto que no se pueden efectuar infinitos barridos, el problema es decidir cual es el número de barridos necesario para obtener una buena estimación de la señal (o lo que es lo mismo para filtrar la misma). Esta decisión evidentemente, sólo puede tomarse si se conoce el nivel de ruido y el grado de exactitud deseado, pero no hay que olvidar que la adquisición de barridos sucesivos de una señal genera números en el ordenador cada vez mayores y que los ordenadores tienen una capacidad limitada de manejo de números grandes. Si esta capacidad se supera, aparece un error denominado de "overflow" y la señal se habrá perdido.

### **Técnicas de convolución**

En dominio de tiempo, la convolución es la operación equivalente al producto en dominio de frecuencias. Cuando se multiplica una función por otra en dominio de frecuencia y se pasa nuevamente la resultante al dominio de tiempo, la función obtenida no es equivalente al producto de las dos funciones originales en este dominio sino a una transformación algo más compleja, consistente en multiplicar y sumar punto a punto ambas funciones.

En dominio de frecuencias es fácil entender que un proceso de filtrado es un proceso de multiplicación, puesto que en la práctica, lo que se hace es multiplicar (convolucionar en el dominio del tiempo) la función de la señal original por la función del filtro (sea del tipo que sea, y en la forma que se ha visto en los filtro analógicos). Este proceso de multiplicación determina que algunas componentes de frecuencia resultan intactas mientras otras son amortiguadas o anuladas en según la forma del filtro. En dominio de tiempo, el proceso no es tan intuitivo pero, resulta obvio, que una transformación equivalente a la anterior debe conducir a resultados similares.

Por tanto, la mayoría de los filtros digitales actúan por convolución en dominio de tiempo o multiplicación en dominio de frecuencias. La función descriptiva del filtro vendrá determinada por el dominio en el que se efectúe el proceso, así como la mayor o menor eficacia en el resultado. Además, en el dominio de tiempo la función polinómica utilizada para el filtrado puede ser expresada mediante un conjunto de números enteros, de tal manera que el proceso de filtrado se resume a multiplicar los puntos de la función original por ese conjunto de números y sumar los resultados de los productos, estando este producto normalizado. Este proceso puede entenderse mejor analizando los diversos filtros particulares que se aplican en la práctica para suavizar las señales.

### **Filtros en dominio de tiempo. Filtro Boxcar de ventana móvil.**

Tanto este como otros filtros se utilizan cuando el promediado de señales no resulta conveniente por la razón que sea (procesos de barrido demasiado lentos como para acumular suficientes, señales poco constantes en el tiempo o transientes, limitaciones de memoria en el computador, etc.). En este caso, se elige una ventana (conjunto de  $n+1$  puntos de la señal digitalizada) cuyo tamaño puede adoptar cualquier valor  $> 3$ , con la condición de que el número de puntos sea impar. Cada una de estas ventanas sirve para filtrar el dato central a la ventana de forma que el valor de ese punto central es el promedio de su valor original junto a los de sus vecinos a ambos lados de la ventana. Una vez calculado este nuevo punto, la ventana se desplaza en una unidad (un dato) generándose una nueva ventana que sirve para el filtrado del nuevo punto central (adyacente al que se acaba de filtrar).

El método resulta eficaz cuando el número de datos es grande y el ruido tiene una frecuencia mucho mayor que la de la señal. No obstante, diversas cuestiones deben tenerse en cuenta:

- a) Los extremos quedan sin filtrar. Esto resulta obvio por la propia definición del filtro, ya que para los datos de los extremos no se puede formar una ventana que contenga vecinos a uno y otro lado. Resulta evidente asimismo, que la extensión de estos extremos sin filtrar depende del tamaño de la ventana elegida.
- b) El tamaño de la ventana tiene una enorme influencia en la eficacia del suavizado. Conforme se va aumentando el tamaño de la ventana los valores de error residual van disminuyendo hasta pasar por un mínimo y continuar aumentando debido a la influencia de los extremos no filtrados.
- c) Aún cuando los extremos no sean de interés y, por tanto, el efecto anterior pueda resultar despreciable, el tamaño de la ventana también determina el rango de frecuencias que resulta filtrado.

Igualmente es importante tener en cuenta que en algunos casos, al hacerse la señal más suave al aumentar el tamaño de la ventana, la distorsión introducida en la señal puede ser considerable. Por tanto, este parámetro ha de ser elegido con sumo cuidado.

Tal como se ha presentado hasta ahora un filtro boxcar de ventana móvil, implica la convolución por una función de ventana cuadrada. Quiere ello decir, que todos los vecinos del dato

a filtrar tienen el mismo peso hasta una cierta distancia, a partir de la cual, los restantes puntos tienen un peso cero. Parece lógico admitir que para ventanas grandes esta situación será muy poco representativa de la realidad. Los puntos contiguos al dato a filtrar probablemente están fuertemente correlacionados con él, pero no tiene porque ocurrir lo mismo con los puntos más alejados. Por tanto, sería más lógico trabajar con ventanas en las que los puntos a la izquierda y derecha del punto central presenten pesos cada vez menores (las ventanas serían entonces algo así como triángulos o curvas gaussianas, etc.). La técnica se conoce entonces como de ventana móvil ponderada o boxcar ponderado. El problema, lógicamente, consiste en seleccionar los pesos adecuados para cada punto. En principio este tipo de filtros será el que proporcionará mejores resultados dentro de esta familia de filtros.

## **2.- OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es estudiar las condiciones de producción de lipasas, en condiciones tales que quede dispuesto, si bien en una etapa preliminar, para la etapa de cambio de escala. Todo ello incorporando al sistema la capacidad de una monitorización y control adecuados.

Para ello se considera necesario trabajar en los siguientes aspectos importantes:

- **Cultivo en continuo.** En trabajos anteriores no ha sido posible realizar cultivos en continuo, ya que después de un incremento de la concentración de lipasas, se inicia un proceso de lavado irreversible. El proceso parece ser debido a una desregulación de la producción del enzima por una elevada concentración de ácido oleico. Como objetivo se presenta la necesidad de investigar sobre el fenómeno y resolverlo de forma que los cultivos en continuo se puedan realizar, consiguiendo estados estacionarios de larga duración y estabilidad.
- **Mecanismos Bioquímicos.** Estudiar el papel de inductores que juegan en la producción de lipasas diferentes ácidos grasos de cadena más corta que el ácido oleico y que a partir de la degradación de éste podrían ser los responsables directos de los inductores de la producción de lipasas.
- **Monitorización.** Puesta a punto de las herramientas necesarias y el entorno para un sistema inteligente capaz de realizar en un proceso de fermentación y a tiempo real el procesamiento de datos, actuar en todos los elementos del proceso, estimar parámetros para variables no medibles directamente, solventando la falta de información de parámetros clave para propósitos de control, el uso de conocimiento heurístico del proceso, y aplicar estrategias de control avanzado. Ello permite la posibilidad de mejora de la productividad en la producción de lipasas, hasta niveles competitivos, para llevar a cabo la implementación a nivel industrial.
- **Estimación.** Estudio y puesta a punto de métodos matemáticos recursivos, que permitan el conocimiento de determinadas variables cuyo seguimiento no pueda obtenerse directamente a partir de métodos analíticos. Se prevee estudiar métodos que abarcan desde la integración-derivación, hasta métodos del tipo observador, filtro de Kalman, método recursivo de error de predicción (RPE) y otros algoritmos avanzados.

- **Modelización.** Desarrollado de un modelo matemático, de carácter dinámico que aglutine y organice toda la información del sistema. Este modelo podrá ser utilizado para operar el sistema en las condiciones óptimas y para diseñar estrategias de operación.

- **Modo de operación.** Definir el(los) modo(s) de operación más adecuado(s) que permita(n) la producción de lipasas en condiciones óptimas de trabajo.

### **3.- MATERIALES Y METODOS**

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Instalación experimental de fermentación.

El crecimiento de la levadura se llevó a cabo en un fermentador Braun Biostat E de 6 litros de capacidad máxima, con 5 L de volumen de trabajo. El fermentador es autoesterilizable en su conjunto, excepto el inyector de entrada de aire y las jeringas de entrada de medio y salida de muestra. Estas tienen que ser esterilizadas individualmente en un autoclave y su posterior conexión al fermentador se realiza a través de un septum, previo flameo con etanol del mismo.

Las entradas/salidas del fermentador se encuentran a dos niveles. Por su parte inferior tiene seis entradas, aproximadamente a la altura de 1.5 L medidos desde el fondo de la cuba. Es el lugar donde se insertan las sondas de temperatura, oxígeno disuelto y pH. Por su parte superior tiene nueve conexiones por donde se acoplan los demás accesorios.

El fermentador posee diversos módulos de control de variables del proceso que permiten fijar diversos puntos de consigna. Las variables sobre las que se tiene posibilidad de realizar una acción de control son:

##### Temperatura:

El sistema de control está formado por un sensor de temperatura PT-100, el cual es una resistencia de platino y un módulo de control PID que actúa sobre el termostato. Utiliza como elemento calefactor una resistencia eléctrica y como refrigerador agua de red. La potencia de la resistencia eléctrica es de 2400 W durante la fermentación, más 1200 W adicionales durante el proceso de esterilización.

##### Porcentaje de oxígeno disuelto:

El sensor es un electrodo de oxígeno esterilizable INGOLD compuesto por un ánodo de plata y un cátodo de platino separados del medio de fermentación por una membrana polimérica permeable al gas, conectándose ánodo y cátodo conductimétricamente mediante un electrolito situado entre la

membrana y el electrodo. El módulo de control es un PI ó PID de banda proporcional variable, el cual puede actuar sobre la electroválvula de entrada de aire al circuito, sobre la velocidad de agitación o sobre ambas.

### pH

La sonda de pH es un electrodo de vidrio combinado esterilizable de doble camisa INGOLD. La cámara interior contiene el electrodo de plata/cloruro de plata y la solución de KCl saturado con AgCl (electrodo de referencia). La cámara exterior está rellena de KCl que actúa como electrolito, sin presencia de plata, poniéndose en contacto con el medio a través del diafragma.

Para evitar la introducción del medio de cultivo dentro de la carcasa exterior, y el consiguiente contacto con el electrolito, la sonda se introduce en una carcasa presurizada, con lo que, además, se consigue una mayor estabilidad y menor deriva de la señal. El módulo de control es un PI de banda proporcional variable, que cuenta con una banda muerta, dentro de la cual la variación de pH no provoca la actuación sobre las bombas dosificadoras de ácido o de base. Dispone también de un contador sobre el tiempo de actuación de ambas bombas, lo que puede proporcionar la cantidad de ácido/base añadida al medio.

### Control de la velocidad de agitación:

Es conocido que se requiere una buena mezcla para que la absorción del oxígeno y de las sustancias nutritivas por parte del microorganismo sea efectiva. Los factores esenciales que influyen son: el tipo y la velocidad de agitación (tipo, número y situación de agitadores), la aireación (caudal y gas suministrado), la viscosidad, el volumen del medio de cultivo y la estructura y volumen de la cuba.

El control de agitación tiene un limitador de máximo y mínimo de revoluciones entre las que efectúa la agitación. La velocidad se puede ajustar en el intervalo entre 50 y 1500 rev/min.

### Control de nivel y antiespumante:

El englobar las dos acciones de control viene motivado por disponer del mismo tipo de elemento sensor basado en el principio de conductividad. Cuando la espuma o el líquido toca la parte

final metálica del electrodo, se cierra el circuito y transmite una señal al módulo de control. Si esta señal se mantiene un cierto tiempo, en función de la sensibilidad que se le proporcione, el módulo conectará la bomba de dosificación de antiespumante o la bomba de extracción de medio durante el tiempo programado por el operador. Después de un tiempo de espera, también programado, se volverán a conectar las bombas, siempre que se mantenga la señal del sensor. También dispone de un contador de tiempo de funcionamiento de las bombas.

Otros elementos de los que dispone el fermentador son:

- Registrador de seis canales, en los que se refleja la evolución del  $pO_2$ , pH, rpm., temperatura, consumo de ácido o base y consumo de antiespumante. Puede, opcionalmente, fijarse únicamente una de estas variables.
- Válvula de seguridad, imprescindible sobre todo en la fase de esterilización con un límite superior de presión de 1,3 bars.
- Manómetro indicador de presión en el interior de la cuba, en un rango entre 0 y 2,5 bars. fabricado por Haenni Corp. Stuttgart (República Federal de Alemania).
- Manómetro de mercurio indicador de presión en la cabecera del fermentador, en un rango entre 0.5 y 1.5 bars.
- Trampa térmica: Consiste en una jeringa para introducir medio recubierta de una resistencia eléctrica que proporciona un cierto nivel de esterilidad al medio introducido dentro del fermentador, sobre todo para experimentos en continuo.
- Termómetro de referencia: con una temperatura máxima de 125° C. de gran utilidad como testigo de que no se produzcan desviaciones de lectura de la sonda PT-100.
- Inyector de entrada de aire y condensador de salida: ambos disponen de un elemento filtrante de piedra porosa de entrada y salida para asegurar la esterilidad del sistema.
- Inyectores de entrada y salida de medio y caldo de cultivo normales, así como un inyector de tres bocas de gran utilidad para adicionar por una misma entrada el ácido, la base y el antiespumante que

pueda requerir la fermentación.

- Bomba peristáltica entrada/salida para realizar la inoculación y control de nivel en cultivo en continuo.
- 2 Bombas dosificadoras (tipo diafragma) con un intervalo de caudales entre 0.1 a 9.9 ml/min y 1 a 99 ml/min.
- Salida de señal analógica de medida de todos los elementos sensores disponibles en el fermentador.
- Entrada analógica y de estado de controlador para control de variables en los puntos de consigna deseados.

#### *Equipo de toma de muestras*

Se utilizó un sistema de microfiltración comercial Millipore, Minitan™. Este equipo es un dispositivo de flujo tangencial que utiliza membranas de microfiltración. La filtración tangencial es una técnica separativa que opera "barriendo" de la superficie de la membrana las moléculas o células retenidas por ésta. Este efecto de barrido limita el tiempo de contacto entre el producto y la membrana, aumentando así la recuperación del material retenido; los sistemas operan eficazmente a baja o alta presión. La combinación de presiones de trabajo adecuadas y la acción autolimpiadora del flujo tangencial permite intervalos de trabajo de caudales más altos, mayores rendimientos y una mejor recuperación. Este principio de filtración presenta una clara ventaja sobre el sistema de filtro tradicional que permite que el material retenido se acumule en la superficie de la membrana. Esto crea un efecto conocido como polarización de concentración que reduce el caudal y el volumen de muestra a procesar. Si bien las células presurizadas con agitación eliminan parte del problema, las altas presiones de trabajo y la agitación mecánica tienden a dañar los componentes sensibles a las fuerzas de cizalla.

Una bomba peristáltica impulsa el caldo de cultivo procedente del fermentador hacia la unidad de microfiltración, el caudal puede oscilar entre 100 y 1000 ml/min, siendo el caudal de trabajo empleado de 500 ml/min. A la entrada de la célula de filtración, se instala un manómetro, como indicador de la posible saturación de las membranas. Se utilizaron dos placas filtrantes modelo HVLP OMP 04 Durapore de 0.45  $\mu\text{m}$ . de tamaño de poro, que proporcionan una superficie de filtración de

120 cm<sup>2</sup>. Se apilan en una disposición alternativa para crear un caudal de retenido en serie. El filtrado pasa por una cámara donde el equipo analítico más conveniente será capaz de coger una muestra para su posterior análisis. El filtrado no necesario para el análisis se incorpora a la corriente de retenido volviendo al biorreactor. Todo el circuito cerrado se encuentra en condiciones de esterilidad.

### *Espectrómetro de masas*

Un espectrómetro de masas cuadrupolar es utilizado para realizar el balance de gases de salida del fermentador. El aparato empleado es un PC 2000 de Spectramass™ con tres tipos de detectores para trabajar a diferentes grados de vacío: modo alta presión, tipo Faraday y multiplicador de electrones (por orden descendente de presión de trabajo). De estos tres, el Faraday es el que da mejor relación entre sensibilidad de la medida y estabilidad frente a la rotura por oscilaciones de presión. El sistema consta de dos bombas centrífugas, 10<sup>-3</sup> mbars, de Alcatel, y una turbomolecular (Balzers) que trabaja a partir de esta presión máxima.

Junto con el analizador propiamente dicho el equipo dispone de un ordenador en el que está implementado un software (PC 2000) que por una parte rige el análisis y por otra almacena los datos en un fichero, al cual se puede acceder tan sólo una vez que se ha terminado la fermentación.

### *Medidor de caudal*

Los aparatos usados fueron Termal Mass Flowmeter/Controller (Brooks Instrument B.V. ), modelo 5851E y 5850TR, basados en la capacidad calorífica del gas. Constan de tres unidades: sensor de caudal, válvula de control y sistema electrónico integrado de control (PID).

El equipo presenta un intervalo de trabajo de 0 - 20 L/min y 0-1 L/min (medidos en condiciones normales), con una precisión de 1% de la escala total, y una repetitividad del 0.2%.

El Termal Mass Flowmeter, va acompañado de una electrónica indicador/controlador y fuente de alimentación modelo 5876 (Brooks Instrument B.V.) cuyas características principales son:

- posee entradas para dos medidores de caudal térmicos
- lectura caudal instantáneo de 0-100% del rango máximo
- potenciómetro de ajuste del punto de consigna

- potenciómetro de selección de punto de consigna local/remoto
- indicador digital de 3 1/2 dígito

#### *Otros aparatos*

- Espectrofotómetro UV-VIS Lambda 5 (Perkin-Elmer).
- Espectrofotómetro UV-VIS Cary 13 (Varian).
- Cámara de flujo laminar BH-10 (Telstar).
- Autoclave HA-30 (Hirayima manufacturing corporation).
- Microscopio Olympus BH-2.
- Sonicador Braun Labsonic 2000
- Placa de adquisición de datos PCL Lab 812
- Placa de adquisición de datos PCL Lab 716
- Centrífuga Centrikon/H-401 (Kontron Analytical).

### 3.2 Reactivos

La clasificación se realiza en función de para qué han sido utilizados:

#### **- Reactivos de fermentación:**

- |   |                          |
|---|--------------------------|
| - Agua desionizada                          |                          |
| - Extracto de malta                         | Adsa-Micro               |
| - Extracto de levadura                      | Pronadisa                |
| - Triptona                                  | Adsa-Micro               |
| - Agar bacteriológico                       | Adsa-Micro               |
| - $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | Panreac para análisis    |
| - $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | Panreac para análisis    |
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                 | Panreac para análisis    |
| - Urea                                      | Panreac purísimo         |
| - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | Panreac para análisis    |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Panreac purísimo         |
| - $\text{NH}_4\text{OH}$ 30%                | Panreac para análisis    |
| - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Panreac purísimo         |
| - Inositol                                  | Fluka para microbiología |

- Biotina	Fluka para microbiología
- Tiamina • HCl	Fluka para microbiología
- Pantotenato	Fluka para microbiología
- Antiespumante	Dow Corning/Braun Biotech
- Acido oleico	Merck purísimo

**- Reactivos análisis de lipasas por valoración.**

- NaOH	Fluka purísimo para análisis
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Panreac purísimo
- Tris	Merck para análisis
- Etanol	Panreac purísimo
- Tricloroetileno	Panreac purísimo
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck para análisis
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Panreac para análisis
- Aceite de oliva	Carbonell
- KOH	Panreac para análisis

**- Reactivos análisis enzimático de lipasas Boehringer.**

trioleína	0,30 mmol/l
tampón tris	26 mmol/ pH 9,2
desoxicolato sódico	19 mmol/l
cloruro cálcico	0,1 mmol/l
colipasa	3 mg/l

**- Reactivos de análisis de proteínas.**

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Probus para análisis
- Tartrato sódico- potásico	Probus para análisis
- Reactivo de Folin Ciocalteu	Merck
- Albúmina de suero bovino	Merck
- NaOH	Fluka purísimo para análisis

**- Reactivos de análisis de proteasas.**

- Tampón fosfato	0.1 M / pH=7.6
- Azocaseína	Sigma

- Papaina Sigma
- Acido tricloroacético Panreac para diagnóstico clínico

**- Reactivos de tinciones.**

Solución de azul de metileno:

- Azul de metileno 0.025 g Panreac
- NaCl 0.9 g Panreac
- KCl 0.042 g Panreac
- CaCl<sub>2</sub> 0.048 g Panreac
- NaHCO<sub>3</sub> 0.02 g Merck

Solución de safranina alcohólica.

- Safranina al 2.5% Panreac  
en disolución alcohólica 10 ml.  
Agua destilada 100 ml.

Solución negro Sudán B.

- Negro Sudán B 0.3g. Panreac  
en 100 ml. de alcohol etílico al 70 %.

Solución de lugol.

- Agua destilada 2 ml.
- Yoduro potásico 2 g. Panreac  
una vez disuelto se añade:
- Yodo 1 g. Panreac  
agua destilada 300 ml.
- Xilol Fluka

### **3.3 Técnicas microbiológicas**

#### **3.3.1. Mantenimiento de la levadura**

En este trabajo se ha utilizado la levadura *Candida rugosa* ATCC 14830, la cual era mantenida en placas de petri conteniendo agar al extracto de malta. Tras 48 h de incubación eran conservadas a 4°C (para reducir su tasa metabólica y evitar pérdidas de agua por evaporación). Las resiembras se efectuaban cada 1 - 2 meses. Independientemente de realizar resiembras con esta periodicidad, se conservaron muestras de levadura en fase de crecimiento sobre glucosa, congelándolas a -20 °C en glicerol.

#### **3.3.2. Preparación del inóculo**

La preparación del inóculo se realizó en frascos de cultivo de 1 litro de capacidad, siendo el volumen de trabajo de 250 ml. El medio de cultivo era (a no ser que se especifique otra cosa), idéntico al usado en la posterior fermentación.

El medio era autoclavado (el sulfato de magnesio separadamente) 20 min. a 120°C, excepto las vitaminas y el cloruro férrico que eran esterilizadas por microfiltración (tipo filtro).

La inoculación se realizó en cámara de flujo laminar, añadiendo al medio completo, ya estéril, varias asas de coll recogidas del cultivo en placa de Petri. Seguidamente, el frasco era incubado a 30°C con agitación magnética fuerte. Tras 24 h. de incubación el inóculo se consideraba listo para ser utilizado.

#### **3.3.3. Preparación de las muestras**

La preparación de la muestra necesitaba unos controles estrictos de esterilidad para contaje de colonias, siembra de placas y preparaciones al microscopio cuando era necesario. Para ello se recogía muestra del fermentador mediante aguja y jeringa estéril, depositándose en un ependorff estéril y relizándose las manipulaciones de la muestra en la cámara estéril. El resto de la muestra, sin requerimientos de esterilidad podía ser centrifugada o tan sólo filtrada para realizar los diferentes análisis de test de actividad, protefna, peso seco, etc...

### 3.3.4. Evaluación de la biomasa

#### *Densidad óptica (D.O.)*

En el sistema en estudio este método de análisis presenta interferencias importantes, sobretodo cuando se tienen concentraciones importantes de sustrato en fase orgánica, ya que las medidas vienen distorsionadas por la presencia de una fase inmisible en la muestra a analizar.

Se realizaron diferentes pruebas intentando utilizar diluciones con una mezcla dioxano-ácido propiónico 1:1 con el objetivo de conseguir una única fase y no tener una microemulsión de fase orgánica en el medio. Los resultados no fueron satisfactorios debido a la aparición de un precipitado probablemente consecuencia de la precipitación de proteína extracelular.

Por todo esto se descartó la utilización de este método como medida de la biomasa.

#### *Peso seco*

Un volumen determinado de muestra es filtrado al vacío a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman) de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Seguidamente, se lavaba con 5 ml de una mezcla de dioxano y propiónico (1:1), con la finalidad de arrastrar la fuente de carbono adherida a la pared celular del microorganismo, que de otra forma interferiría en la media real de biomasa. A continuación, se procedía a lavar varias veces con porciones de 5 mL de agua destilada. Finalmente se colocaba a 85°C hasta alcanzar peso constante (durante toda la noche).

### 3.3.5. Tinción al microscopio y observaciones

Una vez extraída de forma estéril la muestra del fermentador, estas eran conservadas añadiendo 0.1 mL de formaldehído al 20% por cada 1 mL de muestra, manteniéndose a 4° C hasta el momento en que se realizaban las preparaciones para observar con el microscopio.

#### *Tinción simple con azul de metileno*

El procedimiento es sencillo, a 0.1 mL de suspensión de células se le añadió 0.9 mL de solución de azul de metileno. Después de 10 a 20 segundos al observar con el microscopio las células viables aparecen sin teñir, mientras que las no viables tienen un color azul debido a no poder oxidar el azul de metileno.

Alternativamente se prepararon frotis y se fijaron a la llama. Posteriormente se teñían durante 10 a 20 segundos con azul de metileno. Después de lavar la preparación y secar se podía pasar a la observación microscópica.

### *Tinción de inclusiones grasas*

Esta tinción es específica para observar si el microorganismo acumula gránulos de sustancias lipídicas en su interior. El procedimiento consiste en: Preparar un frotis y fijarlo por calor. Cubrir toda la preparación con solución de negro Sudan B y dejar teñir entre 5 y 10 minutos. Decantar y secar el porta. Cubrir con xilol gota a gota. Volver a secar. Teñir con safranina acuosa al 0.5% entre 5 y 10 segundos. Lavar con agua de grifo, secar y observar al microscopio. No obstante dado que este protocolo es el clásico para bacterias, era conveniente aumentar el tiempo de tinción del orden de 2-3 veces.

El resultado de la tinción es que los gránulos de grasa se tiñen de azul oscuro y el resto de la célula de color rosado.

### 3.4. Métodos analíticos

#### 3.4.1. Determinación de la composición elemental del microorganismo

Para determinar la composición elemental del microorganismo, las células fueron extraídas del fermentador a diferentes tiempos a lo largo de cada fermentación. La muestra era centrifugada a 5000 g y lavada dos veces con tampón Tris-HCl 10 mM (pH=8.0). El agregado de células sólidas o "pellet" se secaban a 85 °C hasta peso constante. Después se analizaba la composición en carbono, hidrógeno y nitrógeno en un analizador elemental 240B (Perkin Elmer). El oxígeno fue determinado por diferencia para completar el 100% de la composición.

#### 3.4.2. Test de actividad lipásica

##### *Método de valoración*

Este método es una modificación del propuesto por Ota y col. Las modificaciones afectan a las proporciones entre las fases orgánica y acuosa, el reactivo valorante y el indicador de valoración utilizado.

Se parte de una muestra filtrada a través de un filtro de 0.45 micras de tamaño de poro. Se vierten 5 mL de esta muestra filtrada en un erlenmeyer de 50 mL y se mezclan con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.03 M. A continuación se añaden unas gotas de timolftaleína (indicador que vira de incoloro a azul entre pH 9.3 y 10.5). Para neutralizar el medio de fermentación se añaden unas gotas de NaOH 1M hasta que el indicador empiece a virar. A continuación se añaden 10 mL de tampón Tris-HCl 0.1 M pH = 8.2 y 5 ml de aceite de oliva que se utiliza como sustrato. Se introduce un agitador magnético en el erlenmeyer y se sumerge la mezcla de reacción en un baño termostático a 37° C, al mismo tiempo que se realiza una agitación vigorosa de la mezcla de reacción. En todos los tests, con objeto de que las condiciones de análisis sean repetitivas se utiliza el mismo agitador y la potencia de agitación. El tiempo de reacción es de 50 minutos.

Transcurridos los 50 minutos la mezcla se pasa a un tubo de ensayo, que se introduce en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Dos son los objetivos de este paso: la desnaturalización

de la proteína y la separación de las fases orgánica y acuosa. Posteriormente, la solución se pasa a un embudo de decantación donde se separan ambas fase y se procede a la valoración de la fase orgánica.

La fase orgánica se valora con una solución 0.05 N. de KOH disuelto en una solución al 50% de tricloroetileno y etanol (se conserva en la nevera a 4° C).

Para el cálculo de las unidades de actividad lipolítica se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{meq} = N_{\text{KOH}} * (X - X_0)$$

$$\text{U/mL} = \frac{\text{meq} * 1000 \mu\text{eq}}{(50 \text{ min} * 5 \text{ ml})}$$

X representa la cantidad de valorante consumido por la muestra.  $X_0$  representa la cantidad de valorante consumido por el blanco.

### *Método turbidimétrico*

El método consiste en el seguimiento de la variación de la turbidez de un medio tamponado que contiene un triglicérido, trioleína,  $\text{CaCl}_2$  para formar los jabones del ácido graso a medida que aparece el ácido oleico en el medio y un tensoactivo, desoxicolato sódico, que permite la formación de la emulsión. La disminución de la turbidez se debe a la desaparición de la trioleína al ser roto su enlace ester por acción de las lipasas.

Este análisis es irrealizable en el caso de que se produzca una precipitación de algún componente del medio (sales, proteínas, ácidos grasos ...) ya que falsearía la lectura de la disminución de la turbidez debida al progreso de la reacción de hidrólisis.

El análisis se realiza regenerando en 5 mL de agua la emulsión proporcionada por Boehringer en su test de determinación de lipasas. A 1.5 mL de este substrato se añaden 0.5 mL de muestra, se introducen en una cubeta termostatizada a 42 °C y se realiza lecturas de absorbancia cada 30 segundos a 340 nm en el ultravioleta durante 10 minutos. La pendiente obtenida es función del

nivel de actividad lipolítica presente en el medio. Mediante un calibrado se convierte este valor de la pendiente en unidades de actividad lipolítica/ml equivalentes al test de valoración. El blanco se realiza utilizando como muestra 500  $\mu$ l de agua destilada.

### 3.4.3. Determinación de la actividad lipásica extracelular

Este análisis está basado en una modificación del test Monotest Lipase (Boehringer Kit 159697). Se filtran unos mL de muestra a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m. Se cogen 0.25 mL de este filtrado y se mezclan con 0.75 mL de solución reactivo en una cuveta termostaticada para que la temperatura de reacción sea de 42 °C.

La solución reactivo se obtiene regenerando con 5 mL de tampón Tris-HCl (200 mM/pH=7.40), la emulsión proporcionada por Boehringer. Se realizan medidas de absorbancia cada 30 segundos a una longitud de onda de 340 nm en la zona de UV durante 10 minutos. Mediante el calibrado (Apéndice 6.1) se convierte el valor de la pendiente en unidades de actividad lipolítica/mL equivalentes al test de valoración. El blanco se realiza con agua.

### 3.4.4. Determinación de la actividad lipásica intracelular

Se recogen 5-10 mL de cultivo (según la fase en que se encuentra el cultivo) por centrifugación a 5000  $xg$  10 min. Las células se resuspenden en tampón Tris-HCl 10 mM pH=8.0, se centrifugan de nuevo. Una vez separado el pellet del sobrenadante se resuspende, aproximadamente en cuatro veces su peso húmedo con el mismo tampón. De aquí se toman 600  $\mu$ l para la desintegración ultrasónica de las células en suspensión, en un sonicador BRAUN Labsonic 2000. Todo el proceso se realizaba a 4 °C.

La amplitud de onda iba entre 170-176 watts\*min y el tiempo de sonicación total era de 7 min a intervalos de 1 min. Durante todo el proceso se mantenían las muestras a 0-4° C mediante un baño de hielo y sal. Posteriormente se centrifugaba la suspensión sonicada a 4.000 g durante 10 min a 0-4° C con la finalidad de eliminar los restos de células. El sobrenadante se utilizaba para la determinación de la actividad lipásica intracelular. Posteriormente con este mismo sobrenadante se realizaba el análisis de proteína total. De esta manera la actividad lipolítica intracelular se expresa en U/mg de proteína intracelular.

Si la actividad lipolítica intracelular se quiere expresar en U/mg de biomasa seca el proceso era similar. La diferencia es que el "pellet" recogido por centrifugación, se resuspende en un volumen conocido de tampón (5mL volumen final), para su posterior sonicación. Una vez realizado el análisis de biomasa por peso seco, sin necesidad de realizar el análisis de proteína intracelular, se puede conocer la actividad en U/mg de biomasa seca. Debido a que en algunos casos el porcentaje de proteína total en la biomasa podía variar considerablemente a lo largo de una fermentación, se consideró que esta medida de la actividad intracelular era la más apropiada, al menos a la hora de considerar balances de materia.

### 3.4.5. Análisis de proteasas

El método se basa en la formación de péptidos solubles en ácido tricloroacético debido a la degradación enzimática de la azocaseína (Scheuning 1976).

#### Reactivos

- Tampón fosfato, 0.1 M / pH=7.6
- Solución de azocaseína al 2%
- Acido tricloroacético al 5%

#### Procedimiento

1. Pipetear 0.2 mL de muestra en un tubo de ensayo.
2. Añadir 0.8 mL de tampón fosfato e incubar la mezcla en un baño termostaticado a 30 °C durante 5 min.
3. Adicionar 2 mL de la solución de azocaseína a la mezcla, agitar y mantenerla durante 10 min en el baño a 30 °C.
4. Añadir 2 mL de la solución de tricloroacético, agitar y dejar reposar la muestra durante 30 min a temperatura ambiente.
5. Centrifugar la mezcla a 10000 xg durante 2 min.
6. Leer la absorbancia a 366 nm.

#### Preparación del blanco y la curva de calibrado

El blanco se realiza en cada ensayo utilizando agua o tampón. En este caso la adición de tricloroacético se realiza antes de la incubación a 30 °C.

Para la recta de calibrado se ha utilizado papaína en un intervalo de concentraciones entre 0.1 mg/mL y 1 mg/mL. (Apéndice 6.2)

### 3.4.6. Determinación de la proteína extracelular

Se ha utilizado el método desarrollado por Lowry y col. Esta técnica esta basada en la reacción de ciertos aminoácidos (tirosina y triptófanos principalmente y en segundo término cistina, cistefna e histidina) de las proteínas y una mezcla de molibdato sódico y tungstato sódico en ácido fosfórico (los constituyentes activos del reactivo del Folin-Ciocalteu). Los aminoácidos reducen la mezcla de metaloácidos, produciendo unos compuestos con el característico color azul, cuya intensidad es función de la concentración de proteínas presentes en el medio. Aunque este procedimiento puede tener un considerable número de interferencias en los medios usados, los componentes susceptibles de perturbaciones (p.e., urea ), estan muy por debajo del máximo valor tolerado por el método.

Los reactivos son los siguientes:

#### Reactivos

- A - Solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5%.
- B - Solución acuosa de tartrato sódico potásico al 1 % y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 %.
- C - Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N en ácido sulfúrico.
- D - Solución standard de albúmina de suero bovino de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- E - Solución acuosa de NaOH 1N.

#### Procedimiento

- 1 - Añadir 2 mL de B a 50 mL de A; preparar inmediatamente antes de su uso ( si la solución B es turbia añadir unas gotas de sulfúrico hasta conseguir una solución transparente).
- 2 - A los 0.5 mL de muestra se añaden 0.5 mL de E.
- 3 - Añadir 2.5 mL de la mezcla de reactivos preparada en 1 y esperar 10 minutos.
- 4 - Añadir rápidamente 0.5 mL del reactivo C y esperar 30 min.
- 5 - Leer la absorbancia a 750 nm.

#### Preparación del blanco y curva de calibración

Si las muestras que se quieren analizar no se encuentran dentro del rango de la curva de calibración será necesario una dilución previa a la realización del análisis. La curva de calibración, que se tiene que realizar cada vez que se preparen los reactivos, se recoge en el apéndice 6.3.

Nº del tubo	mL de D	mL	$\mu\text{g/ml}$
1	0	0.5	0
2	0.1	0.4	80
3	0.2	0.3	160
4	0.3	0.2	240
5	0.4	0.1	320
6	0.5	0	400

### 3.4.7. Determinación de proteína intracelular

Con el sobrenadante proveniente del tratamiento de la muestra una vez sonicada para efectuar el análisis de lipasa intracelular se realizaba la determinación de proteína intracelular. Se utiliza igualmente el método de Lowry para proteína total.

### 3.4.8. Análisis de fuente de nitrógeno

#### *Urea*

En este caso se usó otro test enzimático de Sigma diagnostics (Urea Nitrogen, prodecure 640). El método se basa en las siguientes reacciones: la urea es hidrolizada por la ureasa a amonio y dióxido de carbono. El amonio reacciona a continuación con hipoclorito alcalino y fenol, en presencia de un catalizador (nitroprusido sódico), para formar indofenol (azul). La concentración de amonio es directamente proporcional a la absorbancia del indofenol medida a 570 nm.

A cada tubo se le añade 0.5 ml de solución de ureasa y a continuación 10  $\mu\text{l}$  de muestra. Al blanco se le ponen 10  $\mu\text{l}$  de agua destilada en vez de muestra problema. Se incuban 5 - 10 min a 37°C (o a Tª ambiente 15 - 20) mientras la urea es hidrolizada a amonio. A continuación se añade a cada tubo las siguientes soluciones en el orden indicado y mezclando después de cada adición.

1. Solución de fenol nitroprusido: 1 ml
2. Solución de hipoclorito alcalino: 1 ml
3. Agua destilada: 5 ml.

Después de la última adición se deja desarrollar el color a T<sup>a</sup> ambiente unos 20 - 30 min. Pasado este tiempo se lee la absorbancia a 570 nm, usando el blanco como referencia.

Paralelamente se ha construido una recta de calibrado, procesando de la misma manera, con soluciones de urea de concentración conocida.

La cantidad máxima de urea que detecta de forma precisa este método es de 0.75 g/l. Las muestras más concentradas, deben ser diluidas previamente (Apéndice 6.4).

### *Nitrógeno amoniacal*

Se trata de realizar una medida a partir de un electrodo selectivo de amonio, conectándolo a un milivoltímetro y leyendo el potencial de la solución a un pH fuertemente básico, de alrededor de 11. Esto se realiza para que todo el posible nitrógeno susceptible de pasar a amoníaco en solución acuosa se transforme en éste.

Previamente se ha de haber realizado un calibrado del electrodo para la escala de concentraciones en que se está trabajando. (Apéndice 6.5). Para el calibrado del electrodo se representa el logaritmo de la concentración frente al voltaje teniendo que presentar una línea recta. Los resultados se obtienen mediante el ingreso de las medidas de voltaje en la curva de calibrado.

### **3.4.9. Fosfato inorgánico**

Para la determinación de fosfatos se utiliza el método colorimétrico del molibdato amónico, Standard Methods (1980) 424F. A 50 mL de muestra se añaden 2 mL de molibdato amónico, agitar y añadir 5 gotas de solución de cloruro estannoso, leer en un colorímetro pasados unos 10 minutos a 690 nm. Este método presenta bastantes interferencias con los componentes de los detergentes, por lo que se han de tomar precauciones a la hora de manipular las muestras y limpieza del material a emplear (Apéndice 6.6).

### **3.4.10. Ácidos grasos. Ácidos oleico.**

Para la determinación de ácidos grasos de cadena corta se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5840A, con un detector de ionización de llama (FID) conectado a un registrador integrador Hewlett Packard 3392A.

La columna utilizada era una Chromosorb 10% AT 1000 WAW 80/100 de 2m empaquetada. El gas portador era nitrógeno, con un caudal de 30 mL/min.

Las condiciones del análisis son: Temperatura del horno 140 °C, temperatura del inyector 250 °C y del detector 260 °C. A los dos minutos del comienzo del análisis se inicia una primera rampa de temperatura con una pendiente de 4 °C/min, la finalización de la misma sucede al alcanzarse la temperatura de 146 °C. A partir de aquí se inicia una segunda rampa de pendiente 8 °C/min que finaliza a los 240 °C.

La duración del análisis es de 45 minutos. Como este análisis requiere de rampas de temperaturas, se requiere realizar un blanco que se restará de la señal de cada cromatograma. El análisis cuantitativo de los ácidos se realiza utilizando ácido heptanoico como patrón, el calibrado se muestra en el apéndice 6.7.

Cuando los ácidos grasos eran de cadena larga, por ejemplo del tipo ácido oleico, este tipo de análisis no es satisfactorio, ya que los tiempos de análisis aumentan considerablemente además de perder reproducibilidad. Por ello hay que recurrir a columnas de tipo capilar, inyectando muestras previamente metiladas para obtener el éster correspondiente.

### **3.5. Preparación y operación de la fermentación.**

#### **Complicaciones experimentales.**

Aproximadamente unas 24 horas antes del inicio de la fermentación se tiene que conectar la sonda de oxígeno para conseguir su polarización. Antes de esterilizar el medio se procede a la calibración de la sonda de pH, ya que debido a su situación en el biorreactor, el fondo de la cuba, igual que la sonda de temperatura y de oxígeno, no se puede sacar una vez que se tiene introducido el medio en el fermentador. Tanto en los experimentos en discontinuo como en los continuos, el medio de cultivo está formado por una solución básica de composición por litro  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5.5g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g; biotina, 0.008 mg; tiamina.HCl, 0.2 mg; inositol, 0.004 mg y  $\text{FeCl}_3$ , 10 mg. Esta solución era complementada con una fuente de carbono que variaba en concentración dependiendo del experimento. Asimismo el tipo y concentración de fuente de nitrógeno era variable en función del propósito del experimento.

Los componentes del medio son disueltos en 5 L de agua destilada en el propio biorreactor (autoesterilizable) a excepción de la fuente de nitrógeno y sulfato de magnesio, que son autoclavados separadamente.

Con la sonda de pH calibrada se esteriliza el medio utilizando un tiempo de esterilización de 20 minutos a la temperatura de 121° C. Una vez finalizada la esterilización, se procede al calibrado de la sonda de oxígeno a las condiciones de operación. El 0% se obtiene al borbotear nitrógeno hasta alcanzar una estabilización de la lectura. El 100% se ajusta después de alcanzar una lectura estable al burbujear aire en el interior del biorreactor.

Los micronutrientes y el cloruro férrico se añaden al medio en condiciones estériles por microfiltración. El inóculo, la fuente de nitrógeno y el sulfato de magnesio se introducen en el interior del fermentador por mediación de una bomba peristáltica y conexiones estériles de gomas de silicona.

Todas las entradas y salidas que se producen en el fermentador a través de los septums, como el inyector de gases, el inyector de inóculo y las muestras que se extraen mediante jeringas, se realizan flameando con alcohol la entrada del septum y la salida en el caso de que el elemento acoplado al fermentador se retire del mismo.

Los cultivos en continuo se arrancan mediante un cultivo en discontinuo con el mismo procedimiento que se acaba de comentar. En este caso la concentración de fuente de carbono es de 2 g/L, con motivo de aproximar la biomasa y demás parámetros a su valor del estado estacionario lentamente y no provocar oscilaciones que podrían desestabilizar el sistema.

Cuando el microorganismo estaba en la fase exponencial tardía o en la fase de desaceleración, se ponen en marcha las bombas de entrada y de salida de líquido del reactor. La adición de sales minerales y demás componentes solubles en agua, se adiciona mediante la acción de una bomba dosificadora, mientras que el ácido oleico entra por la acción de una microbureta automática comandada por el ordenador, que adiciona periódicamente la cantidad de sustrato predeterminada para cada experimento.

## **4.- RESULTADOS Y DISCUSION**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

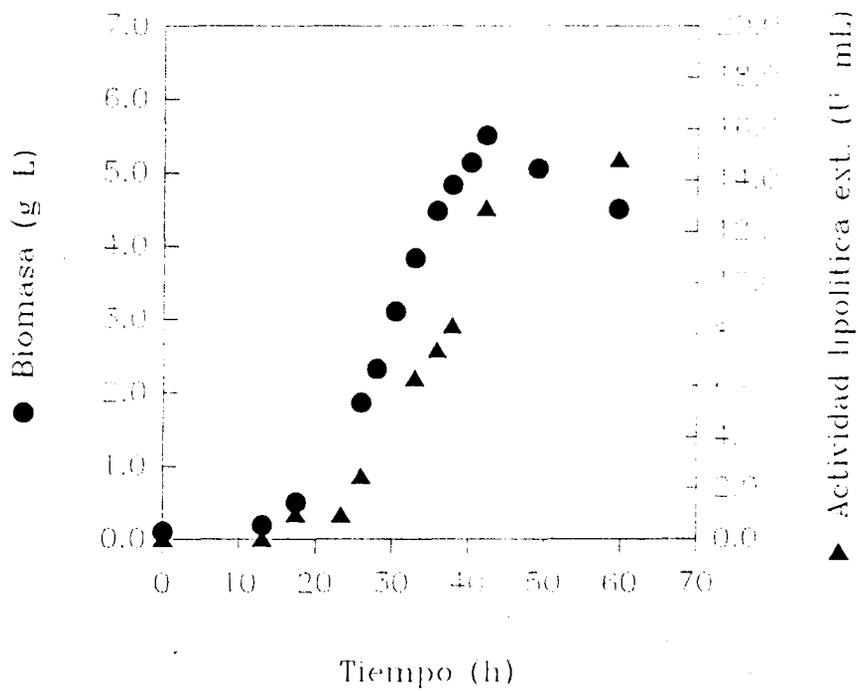
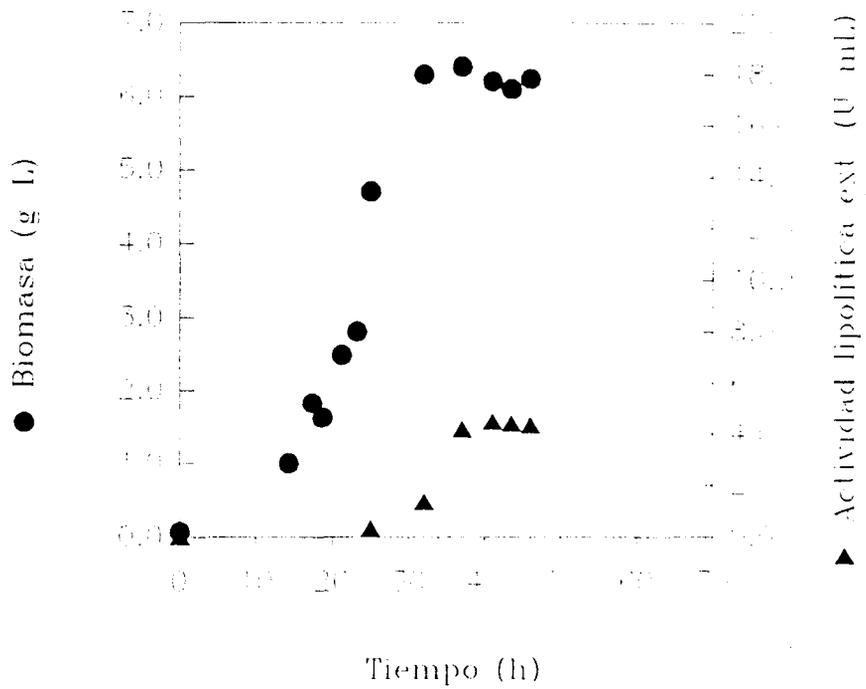
### 4.1. Resumen de resultados previos. Antecedentes experimentales.

En trabajos anteriores (Valero, F., 1990c, del Rfo, 1991) se realizaron experimentos en baño agitado, utilizando glucosa (20 g/L) y aceite de oliva (10 g/L) como fuente de carbono mixta, bteniéndose una mínima producción de actividad lipolítica extracelular ( $< 0.5$  U/mL), para lo cual era necesario un período de tiempo considerable, del orden de unas 80 horas, con un importante producción de etanol (9.9 g/l) (Valero et al. 1991a). Esto sugería que el microorganismo había crecido en condiciones anaerobias debido a un defecto de oxígeno disuelto en el medio, al no realizarse aeración suficiente. De acuerdo con trabajos realizados por Tsujisaka et al. (1973) con *Geotrichum candidum*, un bajo nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación restringiría igualmente la producción de lipasas por *Candida rugosa*.

Al llevar a cabo experimentos en fermentador se observaron diferencias apreciables, cuando, se efectuaba aeración usando igualmente aceite de oliva y glucosa como fuente de carbono mixta. La glucosa fue consumida en las primeras 20 horas, produciéndose niveles mínimos de etanol, con una producción máxima de actividad lipolítica (3.6 U/mL) al final de la fermentación (250 h) (Valero et al 1988). Cuando la biomasa viable descendió, vino acompañada de un importante incremento de proteína extracelular (500 mg/L).

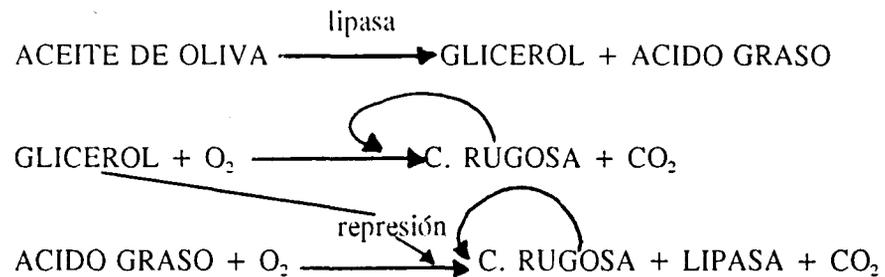
Cuando el microorganismo crecía en glucosa como única fuente de carbono, no se detectaba actividad lipolítica; pero si se utilizaba aceite de oliva en ausencia de glucosa, la producción de actividad lipásica parecía llevarse a cabo en dos etapas diferenciadas ( Del Rfo et al. 1990). En la primera etapa se observaba una baja producción de lipasas ( $< 1$  U/ml), seguida de una segunda etapa que mostraba un aumento significativo (4.5 U/ml) paralelo al incremento de la biomasa (Figura 4.1).

La volución de la fermentación sugería la posibilidad de que el microorganismo utilizaba los componentes del aceite de oliva (glicerol y ácido graso) de forma secuencial. Seguidamente se realizaron experimentos adicionales confirmando esta hipótesis (Del Rfo et al. 1990), mostrando que



**Figura 4.1.** Producción de lipasas por *Candida rugosa*. a) Aceite de oliva 10 g/L. b) Acido oleico 8 g/l.

la producción de lipasas por *Candida rugosa* podría ser descrita utilizando el siguiente esquema de reacción:



El substrato (triglicérido) es hidrolizado a glicerol y ácidos grasos. La biomasa crece utilizando ambos sustratos de manera secuencial, consumiendo glicerol como primer substrato, y posteriormente los ácidos grasos. La concentración de lipasas permanece baja durante el consumo de glicerol, y se incrementa hasta su valor máximo cuando el microorganismo utiliza los ácidos grasos para su crecimiento.

A partir de este esquema de reacción, se desarrolló un modelo matemático, para describir la producción de lipasas por *Candida rugosa*. A partir del esquema de reacción se pueden deducir, planteando los correspondientes balances de materia, 5 ecuaciones diferenciales correspondientes a cada uno de los reactantes, con 3 velocidades principales de reacción y 3 rendimientos (Serra et al. 1992).

$$d \text{ oil}/dt = -v_{lp} \quad (1)$$

$$d \text{ iau} = \frac{1}{1 + \left(\frac{\text{gly}}{\text{gld}}\right)^3} \quad (2)$$

$$d \text{ fa}/dt = 0.9 \cdot v_{lp} - \mu_{fa} \cdot cr \cdot d \text{ iau} \quad (3)$$

$$d \text{ gly}/dt = 0.1 \cdot v_{lp} - \mu_{gly} \cdot cr \quad (4)$$

$$d \text{ cr}/dt = Y_{cs} \cdot \mu_{sly} \cdot cr + Y_{ca} \cdot \mu_{fa} \cdot cr \cdot d \text{ iau} \quad (5)$$

$$d \text{ lp}/dt = Y_{la} \cdot \mu_{lp} \cdot cr \cdot d \text{ iau} \quad (6)$$

- Oil - Concentración de aceite de oliva ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- Fa - Concentración de ácidos grasos ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- Gly - Concentración de glicerol ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- Cr - Concentración de biomasa (peso seco en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
- Lp - Actividad Lipolítica extracelular ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
- $v_{\text{ip}}$  - Velocidad de hidrólisis de aceite de oliva
- $\mu_{\text{gly}}$  - Velocidad de consumo de glicerol por unidad de biomasa
- $\mu_{\text{fa}}$  - Velocidad de consumo de ácidos grasos por unidad de biomasa
- $\mu_{\text{ip}}$  - Velocidad de producción de lipasas por unidad de biomasa
- $Y_{\text{ca}}$  - Rendimiento biomasa/ácidos grasos (g/g)
- $Y_{\text{cg}}$  - Rendimiento biomasa/glicerol (g/g)
- $Y_{\text{ia}}$  - Rendimiento lipasa/ácidos grasos ( $(\text{U}/\text{ml})/(\text{g}/\text{l})$ )
- k1 - Velocidad específica de crecimiento sobre ácidos grasos
- $K_{\text{c}}$  - Constante de saturación
- $K_{\text{i}}$  - Constante de inhibición para la lipasa
- k11 - velocidad específica de crecimiento sobre glicerol
- K3 - Constante de hidrólisis del aceite de oliva

Se llevaron a cabo dos experimentos diferentes para validar el modelo. El primero fue un crecimiento un 10 g/L de aceite de oliva, seguido de un pulso de glicerol después de 20 horas de fermentación. Como se puede ver en la figura 4.2 el modelo es capaz de explicar el comportamiento experimental. El segundo experimento se realizó utilizando como sustrato una mezcla de ácido oleico (8 g/L) y glicerol (2 g/L). En la figura 4.3 se observa un buen ajuste, produciéndose un comportamiento claramente diaúxico, que corrobora la hipótesis de inhibición en la producción de lipasas debido al glicerol. No existe un incremento en la actividad lipolítica en la primera fase del crecimiento, mientras que durante el consumo de ácidos grasos (cuando el glicerol ya se ha agotado), sí que se produce dicho incremento.

De los resultados obtenidos se concluye que el modelo propuesto es válido para explicar la producción de lipasa por *Candida rugosa* cuando crece sobre aceite de oliva en fermentación en discontinuo. Uno de los resultados más interesantes es el hecho de obtenerse diferentes rendimientos (lipasa/sustrato) en función del sustrato utilizado. Independientemente de la explicación básica del mecanismo de producción, está claro que desde el punto de vista de desarrollo del proceso, los ácidos

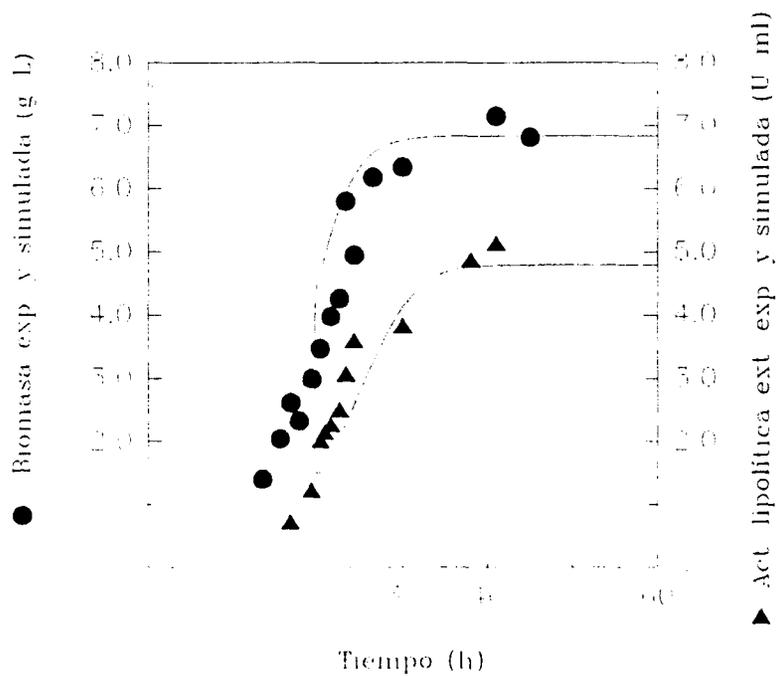


Figura 4.2. Fermentación con 10 g/L iniciales de aceite de oliva con un pulso de glicerol (2 g/L). Datos experimentales y simulados.

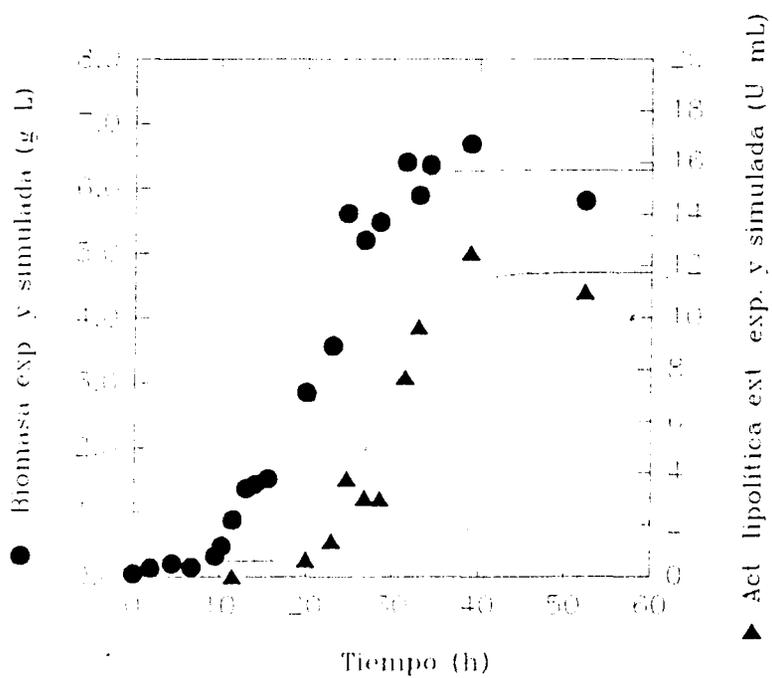


Figura 4.3. Fermentación con 2 g/L de glicerol y 8 g/L de ácido oleico. Datos experimentales y simulados.

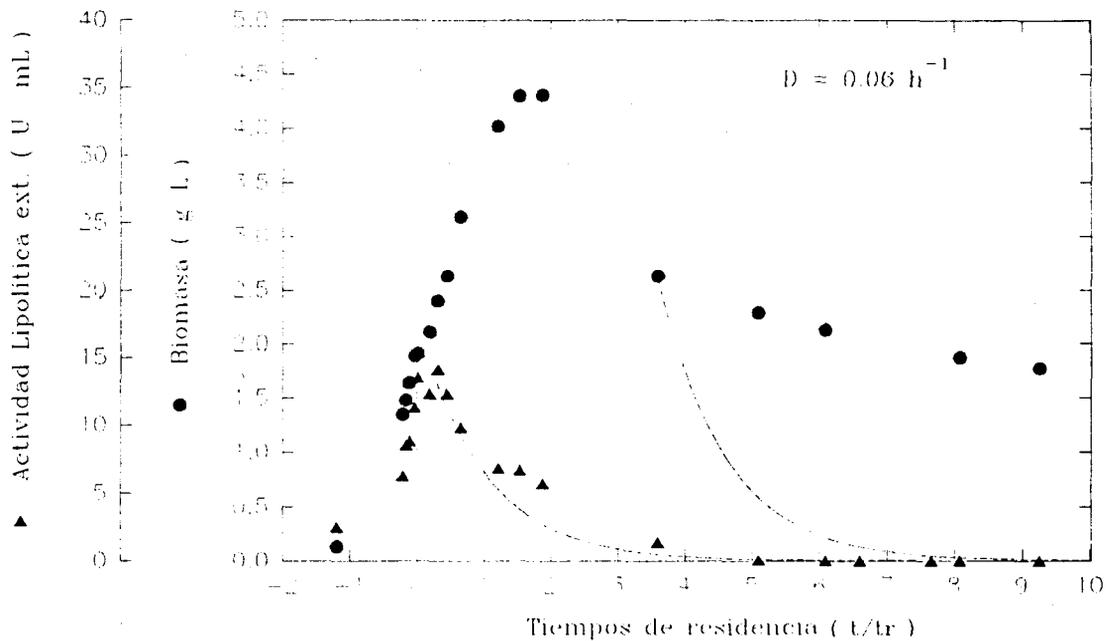
grasos son los mejores sustratos para la producción de lipasas, ya que el rendimiento es del orden de 3 veces mayor que para el aceite de oliva.

En este momento el sistema estaba caracterizado por un sustrato insoluble, ácido graso, la producción de lipasas estaba asociada con el crecimiento del microorganismo y se tenían bajos niveles de proteína extracelular (100 mg/L). Estos hechos tenían consecuencias positivas: la posibilidad de trabajar con fermentaciones en continuo, un proceso de purificación de proteína más barato y una mayor estabilidad enzimática del medio, probablemente debido a una baja o nula concentración de proteasas.

Al hacer los primeros estudios sobre fermentación en continuo se observaron los siguientes hechos ( Figura 4.4):

- La concentración de lipasa en el medio alcanza un valor máximo importante al cabo de, aproximadamente, un tiempo de residencia después de haber empezado la operación en continuo. A continuación, la concentración de lipasa en el medio desciende rápidamente, siguiendo una curva que coincide prácticamente con la del lavado del reactor.
- La concentración de lipasa intracelular sigue un comportamiento paralelo al anterior, de donde parece concluirse que el máximo de concentración viene acompañado de la interrupción de la producción de lipasa (síntesis).
- La concentración de *Candida rugosa* en el medio disminuye después del máximo, aunque lo hace con una pendiente menor que la correspondiente al lavado ( $0 < \mu < D$ ).
- Cuando se utiliza el microorganismo que ha experimentado el proceso anterior, como inóculo para arrancar un nuevo crecimiento, manteniéndose parte del medio final de fermentación, no se observa ninguna producción de lipasas, creciendo más lentamente y con morfología celular aparentemente diferente. De este modo, parece ser que manteniendo las células en el medio final de fermentación, suplementado con nuevo medio, la pérdida de la capacidad de producción de lipasas es, en estas condiciones, irreversible.

Por otra parte se puso a punto una instalación experimental en donde poder estudiar la evolución del proceso, modificando la previamente existente, en la que, además del fermentador de 5 L de capacidad, se desarrollaron las siguientes unidades acopladas al proceso:



**Figura 4.4.** Gráfica correspondiente a una fermentación en continuo con problemas de lavado.

- Acoplamiento de un espectrómetro de masas cuadrupolar, para realizar el análisis de los gases de salida del fermentador. De este modo, se podían calcular las velocidades de consumo de oxígeno (OUR) y de producción de  $\text{CO}_2$  (CER), así como el coeficiente respiratorio (RQ), de forma discreta.

- Un analizador automático de la concentración de lipasa existente en el medio, capaz de realizar hasta 8 análisis por hora, basado en una toma de muestra estéril y su procesamiento, en el cual se medía la pérdida de turbidez de una emulsión de trioleína; por efecto de la acción de la lipasa, obteniéndose una señal que se trataba por un ordenador conectado al proceso.

Aprovechando la elevada frecuencia de análisis que podía permitir el analizador automático de actividad lipásica, se propuso su utilización para solventar los problemas generados por la operación en continuo del fermentador.

El máximo de concentración de lipasa, que parece ser debido a una desregulación de la producción del enzima por una elevada concentración de ácido oleico acacia en el estado transitorio, es suficientemente elevado como para sugerir una estrategia de producción basada en provocarlo y detener el proceso de forma inmediata, utilizando para ello el medidor automático de actividad lipásica.

## 4.2 Experimentos de fermentación.

A partir de los antecedentes experimentales se profundizó en la búsqueda de fuentes de carbono y nitrógeno que permitieran un aumento de productividad y mejora del proceso. Igualmente se estudiaron diferentes estrategias de operación tanto en modo de operación (discontinuo, semicontinuo y continuo), como variaciones de estos, ayudándose de nuevos equipos o aprovechamiento de los ya incluidos preliminarmente, con ciertas mejoras y modificaciones.

### 4.2.1. Estudios de diferentes fuentes de carbono. Ácidos grasos.

Anteriormente se había estudiado que el ácido oleico era un buen inductor de la actividad lipolítica en *Candida rugosa* (Del Rfo et al. 1990). Para elucidar si el mecanismo de inducción de la producción de lipasa era debido a este mismo compuesto o a un metabolito derivado del catabolismo del ácido oleico, se probaron diferentes ácidos grasos como inductores. Se trabajó con ácidos grasos de número par de carbonos, como el ácido butírico ( $C_4$ ), caproico ( $C_6$ ), caprílico ( $C_8$ ) y cáprico ( $C_{10}$ ). Igualmente se probaron los ácidos valérico ( $C_5$ ) y heptanoico ( $C_7$ ) (Obradors et al. 1993). Por otra parte también era interesante esta búsqueda de fuentes de carbono alternativas, debido a los inconvenientes que para una futura aplicación industrial podría conllevar el hecho de trabajar con un sistema multifásico.

En todas las fermentaciones era imprescindible mantener un nivel mínimo de oxígeno disuelto (20%), ya que como se vio en anteriores trabajos, el crecimiento debía realizarse evitando las condiciones de anaerobiosis.

Se llevó a cabo una serie preliminar de experimentos en botellas, utilizando estos compuestos como fuentes de carbono a concentraciones entre 0.2 y 2 g/L. Se incubaron al menos durante 72 horas, a 30 °C con agitación magnética vigorosa y un flujo de aire de 0.1 L/min (0.4 vvm). El microorganismo era capaz de crecer en todos los ácidos grasos probados, mostrando diferente avidez por cada uno de ellos.

Como puede verse en la tabla 4.1, al fijarse en la actividad lipolítica, los ácidos caprílico y cáprico fueron los mejores inductores, pero siempre a bajas concentraciones. De este modo, *Candida rugosa* no podría utilizar estos sustratos a altas concentraciones probablemente debido a su toxicidad.

Por el contrario, el ácido butírico, que en términos de producción de biomasa, fue el mejor sustrato, prácticamente no indujo la producción de lipasas. El ácido caproico, el cual fue también un buen sustrato para el crecimiento, indujo la producción de lipasas pero menos que los ácidos caprílico y cáprico. Comparando estos resultados con los obtenidos para el ácido oleico, se ha de

Substrato	Concentración (g/L)	Biomasa (g/L)	Actividad Lip. extracelular (U/mL)	Productividad (U/g biomasa)
Acido butírico (n-butanoico)	0.5	0.893	0.320	358
	1.0	1.790	0.365	204
	2.0	3.160	1.39	440
Acido Valérico (n-pentanoico)	0.5	0.324	0.00	0.00
	1.0	0.383	0.00	0.00
	2.0	0.102	0.00	0.00
Acido Caproico (n-hexanoico)	0.5	0.624	4.06	6506
	1.0	1.520	4.46	2930
	2.0	0.374	0.70	1870
Acido n-heptanoico	0.5	0.320	0.00	0.00
	1.0	0.030	0.00	0.00
	2.0	0.020	0.00	0.00
Acido caprílico (n-octanoico)	0.5	0.350	7.41	21171
	1.0	0.823	5.23	6350
	2.0	0.050	0.00	0.00
Acido cáprico (n-decanoico)	0.2	0.234	3.48	14870
	0.5	0.450	6.68	14840
	1.0	0.033	0.00	0.00
Acido Oleico (octadecenoico)	0.5	0.750	0.20	267
	1.0	1.05	1.8	1710
	2.0	2.05	8.0	3902

Tabla 4.1 Crecimiento de *C. rugosa* sobre diferentes ácidos grasos.

denotar que el ácido caprílico es mejor sustrato en términos de productividad (U/g de biomasa), seguido del ácido cáprico.

Se ha de prestar especial atención en los ácidos grasos de número impar de carbonos. Así, aunque el ácido valérico fue capaz de desarrollar el crecimiento, no indujo la producción de lipasas. Además el ácido heptanoico que para concentraciones de 0.5 g/L permitió el crecimiento, no indujo el enzima.

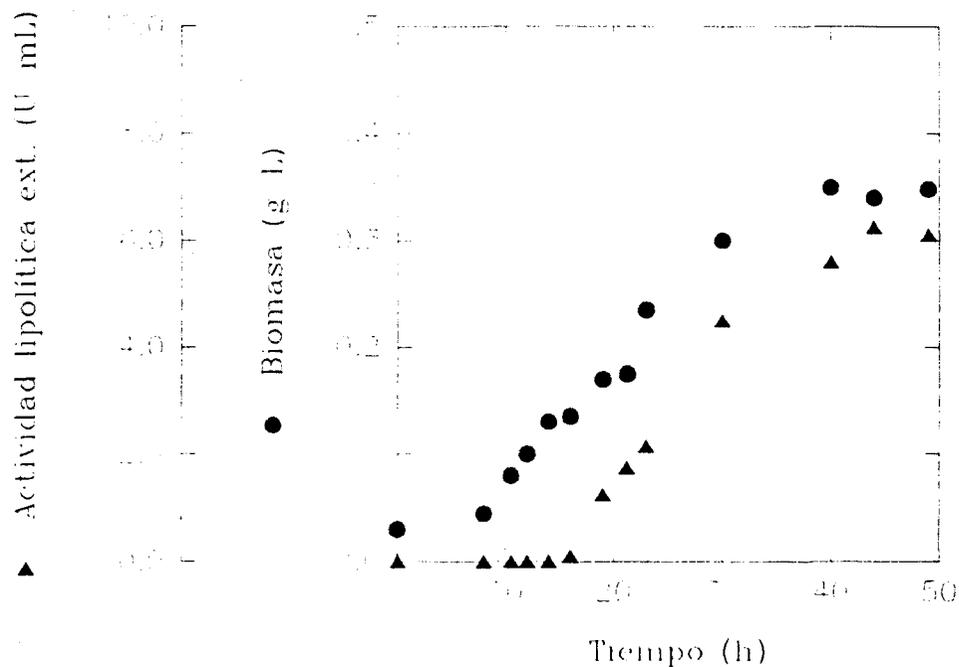
La solubilidad de estos compuestos debe ser tenida en cuenta para poder interpretar mejor los resultados. Se puede observar que de todos estos ácidos, aquellos que presentan mayor solubilidad en agua permiten un mayor crecimiento, y que los que presentan una solubilidad menor muestran un rendimiento más bajo. Este es el caso del butírico y caproico que permitieron el mejor crecimiento, y que tienen solubilidades altas en agua ( $> 10$  g/L a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Por el contrario los ácidos caprílico y cáprico que tienen solubilidades bajas (0.7 y 0.2 g/L a  $20^{\circ}\text{C}$  respectivamente), permitieron un crecimiento menor. Los ácidos valérico y heptanoico han de ser observados separadamente de los otros ácidos grasos, debido a que para su solubilidad, se obtuvo un rendimiento mucho mayor respecto a la producción de biomasa.

El efecto del ácido oleico ha de ser estudiado aparte, ya que aun teniendo una muy baja solubilidad, es capaz de permitir el crecimiento hasta incluso a concentraciones de 8 g/L (Del Rfo et al. 1990). Esto podría ser explicado porque los ácidos grasos de cadena corta son más tóxicos para el microorganismo que los de cadena larga. Si un metabolito (ácido graso) derivado de la  $\beta$ -oxidación del ácido oleico, ácido caprílico o cáprico, es el inductor real de la producción de lipasas, su concentración había de ser menor de 1 g/L para evitar los efectos tóxicos observados en el crecimiento de los microorganismos. Los ácidos grasos con número de carbonos menor de seis, ácido butírico, no tuvieron efectos de inducción en la producción de lipasas.

### ***Experimentos en fermentador.***

Debido a que los ácidos caprílico, cáprico y oleico fueron los mejores inductores de la actividad lipolítica, se estudiaron más ampliamente realizando cultivos en fermentador.

En la figura 4.5 se puede ver la evolución de un crecimiento en discontinuo de *C. rugosa* utilizando ácido caprílico 0.5 g/L como fuente de carbono. En este experimento los niveles de actividad lipolítica y de biomasa alcanzados al cabo de 40 horas de fermentación, cuando ya se había alcanzado la fase endógena fueron de 6.0 U/mL y 0.35 g/L respectivamente.



**Figura 4.5.** Fermentación en discontinuo utilizando ácido caprílico 0.5 g/L.

En la figura 4.6 se muestra el crecimiento sobre ácido cáprico, con una concentración inicial de 0.5 g/L. El microorganismo mostró un comportamiento semejante a cuando se utilizó ácido caprílico, alcanzando niveles similares respecto a la producción de biomasa (0.4 g/L) y actividad lipolítica (5.2 g/L) a las 40 horas de fermentación.

Por último, el comportamiento del crecimiento y la producción de lipasas, cuando se utilizó ácido oleico 2 g/L, como se puede ver en la figura 4.7, presenta unos niveles máximos de biomasa y actividad lipolítica de 2.2 g/L y 7.4 U/mL respectivamente a las 20 horas de fermentación. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos en botella, y ello demuestra que la aeración y agitación en estos eran correctas. Si ello no hubiera sido así, se hubiera producido una restricción en la producción de lipasas, ya que se había demostrado que un defecto de oxígeno en el medio de cultivo producía tales efectos. Igualmente, una agitación no favorable hubiera tenido efectos sobre el crecimiento y la velocidad de éste.

A pesar de que las productividades (U/g de biomasa) en las fermentaciones con ácido caprílico y cáprico son mayores que con ácido oleico, desde el punto de vista de producción industrial, la velocidad de producción de lipasa (U/mL\*h) cuando se usa el ácido oleico como sustrato (1.42 U/ml.h) es mayor que con ácido caprílico (0.317 U/ml.h) y ácido cáprico (0.375 U/ml.h). Este

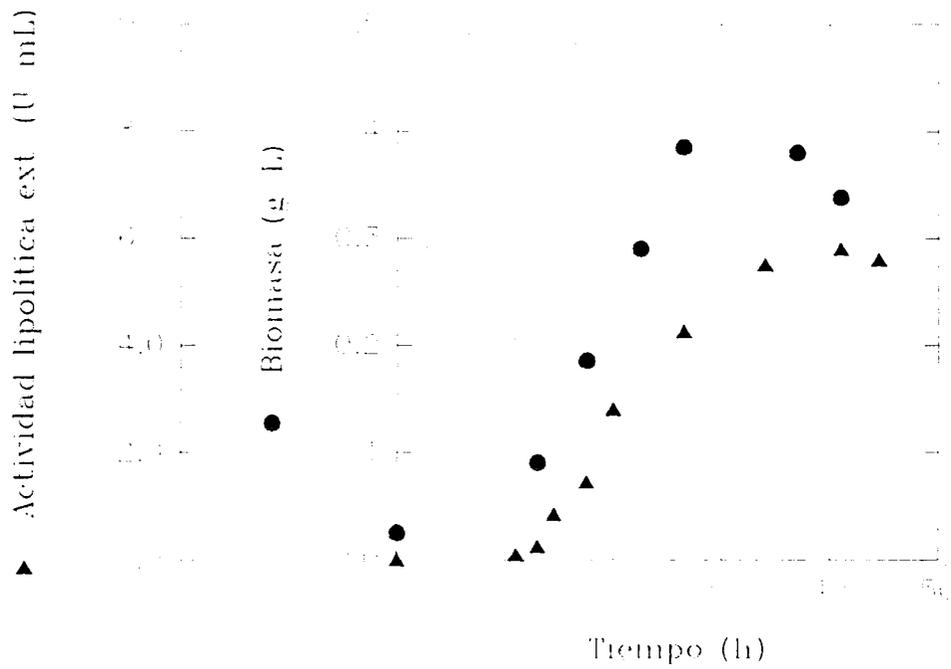


Figura 4.6. Fermentación en discontinuo utilizando ácido cáprico 0.5 g/L.

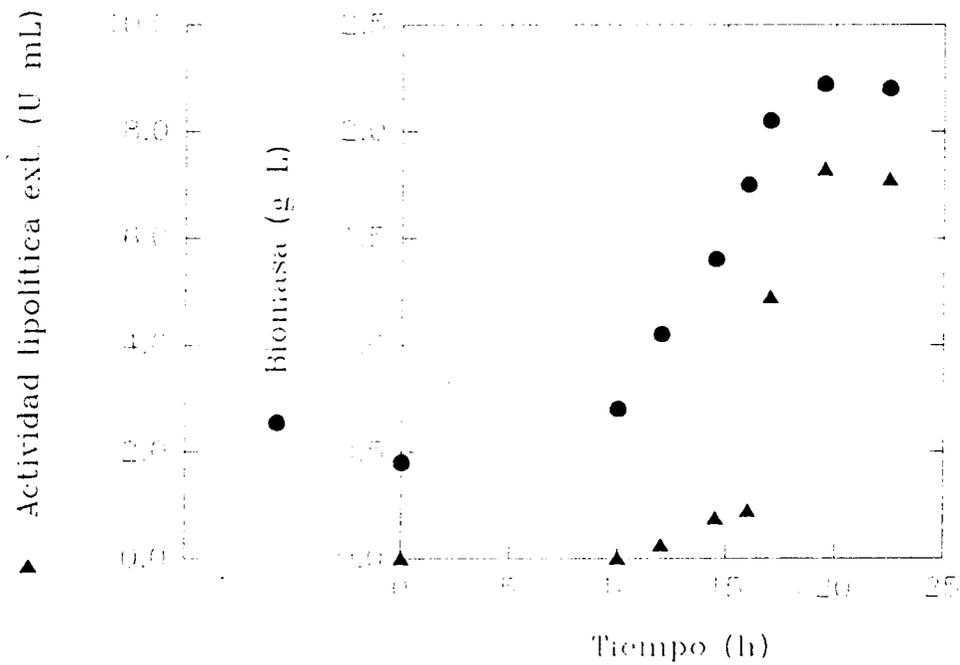


Figura 4.7. Fermentación en discontinuo con ácido oleico 2 g/L.

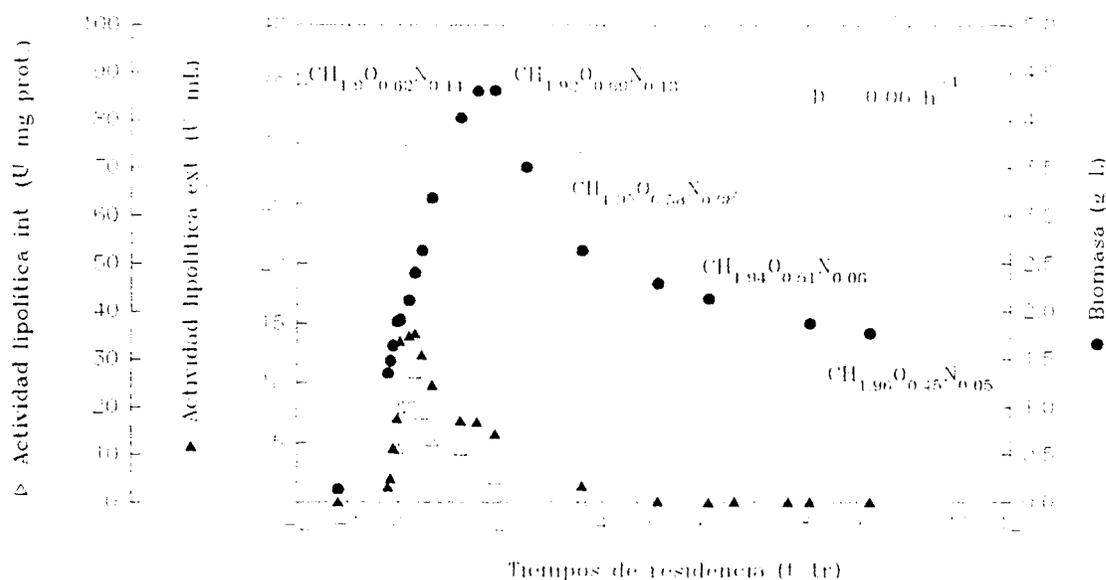
hecho, y el problema de toxicidad detectado utilizando estos últimos ácidos, sugieren que el ácido oleico sea el mejor sustrato entre los estudiados para llevar a cabo el proceso industrial de producción de lipasas por *Candida rugosa*.

#### **4.2.2 Fermentación en continuo I. Influencia de la fuente de nitrógeno.**

En los experimentos preliminares realizados en condiciones en continuo con ácido oleico como fuente de carbono, la actividad lipolítica extracelular en el período transitorio, es mucho mayor que la que correspondería a una relación simple o rendimiento entre el microorganismo y el ácido oleico. Además, en las siguientes horas la actividad lipolítica se reduce hasta niveles indetectables. Para elucidar si la drástica reducción es debida a desactivación enzimática, supresión de la síntesis o limitación en la excreción celular, se estudió la relación entre la actividad lipolítica intracelular y extracelular. Simultáneamente se creyó interesante determinar la composición elemental de la biomasa en diferentes puntos a lo largo de la fermentación.

En la figura 4.8 se muestran los resultados de un cultivo continuo. Las condiciones de operación fueron: la fase inicial fue un cultivo en discontinuo con el medio básico conteniendo 2 g/L de ácido oleico y 4 g/L de urea (Volumen = 5 L). En esta fase, la evolución de la velocidad de producción de dióxido de carbono (CER) fue monitorizada con la ayuda de un espectrómetro de masas cuadrupolar (Spectramass PC 2000). Cuando la CER disminuía, esto es, la velocidad específica de crecimiento decrecía hasta valores próximos a la velocidad de dilución planeada se empezaba la operación en continuo (figura 4.9). De hecho, esto aseguraría "a priori" un buen arranque, minimizando los posibles fenómenos de estado transitorio involucrados (Cooney et al. 1981).

Cuando se realizaron los estudios preliminares de fermentación en discontinuo utilizando ácido oleico, el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento fue de 0.16-0.18 h<sup>-1</sup>. La velocidad de dilución para el cultivo en continuo fue fijada en D=0.06 h<sup>-1</sup>, la concentración de ácido oleico 8 g/L y de urea 8 g/L como fuente de nitrógeno, además de las otras sales minerales y compuestos del medio de fermentación. Este valor de la velocidad de dilución fue considerado como suficientemente conservativo para poder llevar a cabo la fermentación en continuo con unas mínimas garantías de que no se produciría el lavado, debido a que la velocidad de dilución fuera mayor que la velocidad específica de crecimiento en estas condiciones.



**Figura 4.8.** Fermentación en continuo utilizando ácido oleico 8 g/L como fuente de carbono y Urea 8 g/L como fuente de nitrógeno.

De los resultados experimentales obtenidos se pueden resaltar varios hechos:

1. El comportamiento de la lipasa intracelular y extracelular es semejante. Ambas actividades aumentan al principio de la operación en continuo y después de dos tiempos de residencia disminuyen drásticamente. Cuando se sobrepasa un nivel crítico la síntesis es reprimida y hasta incluso suprimida, como se deduce de que la tendencia es prácticamente la de un proceso de lavado puro. De este modo, se puede descartar que la reducción drástica sea debida a que la excreción del enzima sea el paso limitante, ya que no se detecta una acumulación de lipasa intracelular.

2. Durante dos tiempos de residencia, la biomasa alcanza valores próximos a las cantidades de ácido oleico aportadas y el rendimiento biomasa/substrato obtenido en discontinuo. Después de esto, la concentración de biomasa comienza a disminuir, a consecuencia de que el microorganismo crece con una velocidad específica por debajo de la velocidad de dilución.

3. El porcentaje de nitrógeno en la composición del microorganismo decrece hasta valores

tres veces menor que el porcentaje inicial. Se debería descartar un defecto de la fuente de nitrógeno total en el medio, ya que de acuerdo con la composición elemental obtenida en cultivos en discontinuo, la fuente de nitrógeno se encontraría en exceso en el medio básico. Entonces, cabría pensar que sea debido a un problema adicional, tal como la accesibilidad, disponibilidad o el transporte de la fuente de nitrógeno.

4. La observación con el microscopio mediante contraste de fases (Figura 4.10a) muestra que la morfología celular cambia a lo largo de la fermentación. Durante la fase en discontinuo y al principio de la operación en continuo, el microorganismo crecía en agregados que atrapan pequeñas gotas de ácido oleico, pero después de tres o cuatro tiempos de residencia, cuando se observó el descenso del porcentaje de nitrógeno celular se observó, el patrón de crecimiento es diferente, y se puede observar que hay más porcentaje de células que crecen aisladas que en agregados. Alrededor de nueve o diez tiempos de residencia, las células parecen más pequeñas y prácticamente todas ellas crecen aisladas, con acumulaciones lipídicas intracelulares (figura 4.10b). La observación microscópica y la apreciación visual directa, muestra también que se había formado una emulsión en el medio de cultivo.

5. Al final del experimento se recogió el medio de fermentación, mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0.45 micras, y la emulsión observada se mantuvo durante un mes a temperatura ambiente. Se realizaron experimentos adicionales mezclando diferentes componentes del medio mineral, sin microorganismos, demostrando que la urea (8 g/L) y el ácido oleico (8 g/L) con una agitación de 500 rpm eran capaces de formar una emulsión estable después de unas 24 horas. Con concentraciones más bajas de urea y de ácido oleico, ambos a 2 g/L y la misma velocidad de agitación que anteriormente, la emulsión también se formaba al cabo de unas 72 horas. Estos resultados sugirieron que la emulsión urea/oleico dificulta la accesibilidad de la urea por parte del microorganismo y entonces el porcentaje de nitrógeno en la composición del microorganismo disminuye.

Ha sido descrito por otros autores (Ratledge et al. 1989) que las levaduras oleaginosas acumulan sustancias lipídicas cuando hay una deficiencia de un nutriente en particular, normalmente nitrógeno, y un exceso de nutrientes que contienen carbono. De este modo, cuando el nutriente limitante se agota, la proliferación celular cesa y el exceso de fuente de carbono continua siendo asimilada por la célula y canalizada hacia lípidos. Esto podría explicar las acumulaciones lipídicas observadas cuando el porcentaje de nitrógeno descendía en el microorganismo.

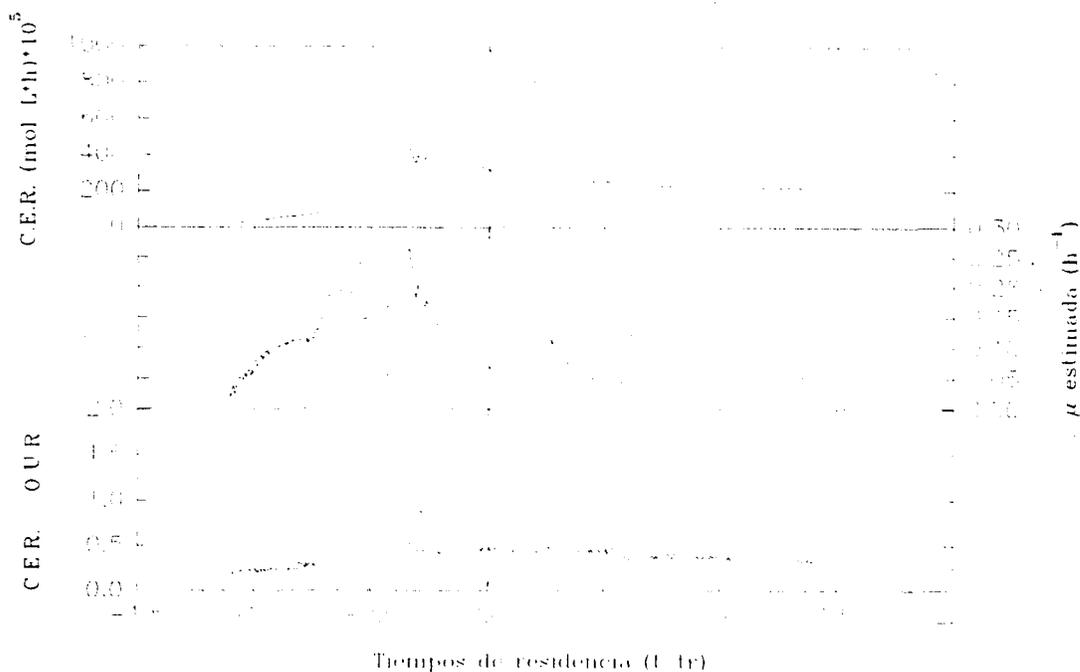
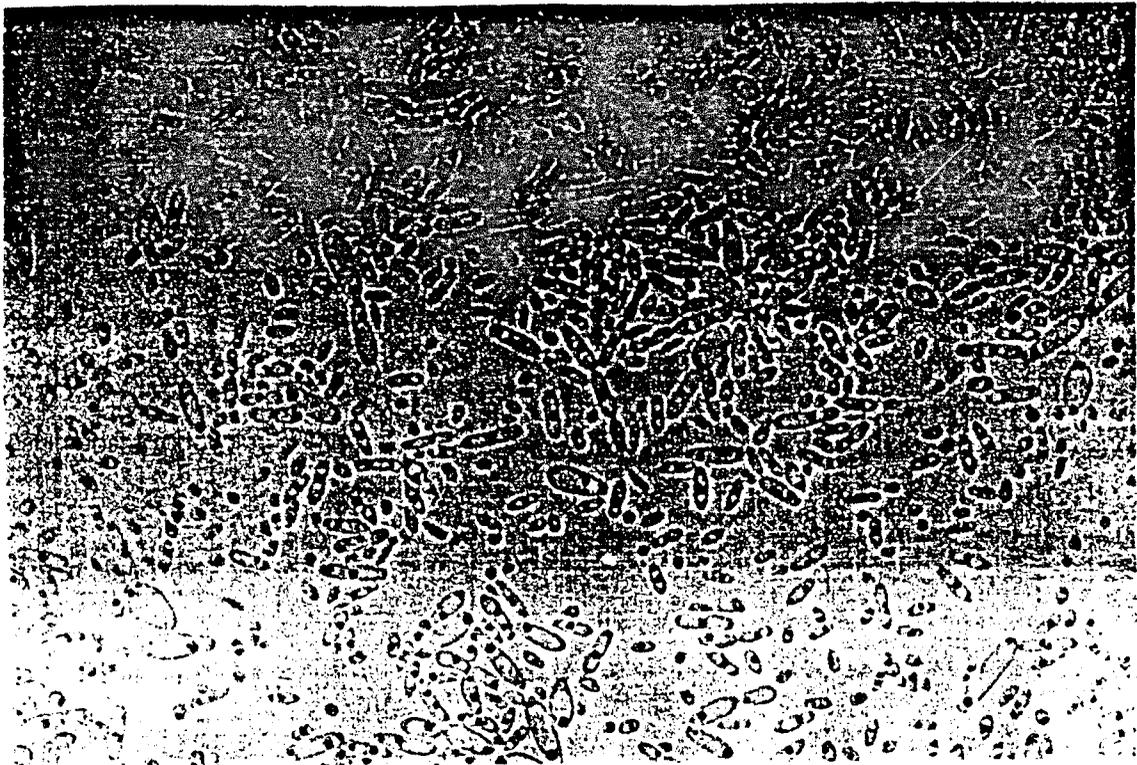


Figura 4.9. Arranque de una operación en continuo con ayuda de un espectrómetro de masas.

FIGURA 4.10a Serie de fotos en la que presenta como evoluciona el aspecto y morfología celular a lo largo de un continuo que se lava.



FIGURA 4.10b Foto en la que se muestran las inclusiones lipídicas.



Como una de las conclusiones de los experimentos previos, se ha observado que la formación de la emulsión se retarda para concentraciones bajas de ácido oleico. Se llevó a cabo un cultivo en discontinuo de 2 g/l de ácido oleico para comprobar la validez de que a esta concentración de ácido oleico no había formación de la emulsión. La evolución de la fermentación se presenta en la figura 4.11. El valor del rendimiento biomasa substrato ( $Y_{v,s} = 0.68$ ) fue similar al cultivo en discontinuo con 8 g/L (figura 4.1b) pero con un rendimiento lipasa/substrato ( $Y_{L/S} = 3.86$ ) mayor que en el cultivo de 8 g/L ( $Y_{L/S} = 2.83$ ).

6. Otra observación experimental interesante fue el resultado de introducir en la corriente de entrada un cierto nivel de lipasa comercial (AY Amano 30, 5 U/mL en el fermentador). El descenso de la concentración de biomasa se detuvo, alcanzándose un valor estacionario, lo que muestra que el crecimiento de *Candida rugosa* sobre ácido oleico se ve favorecido por la presencia de un cierto nivel de lipasa extracelular.

7. La suplementación del medio con extracto de levadura y pantotenato cálcico no cambia el comportamiento general de la fermentación en continuo.

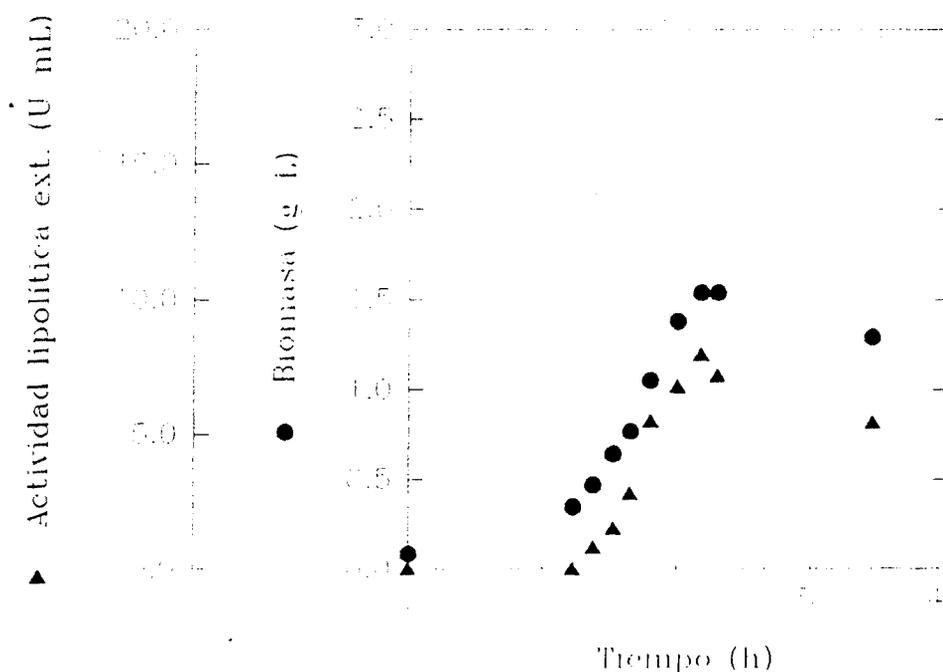
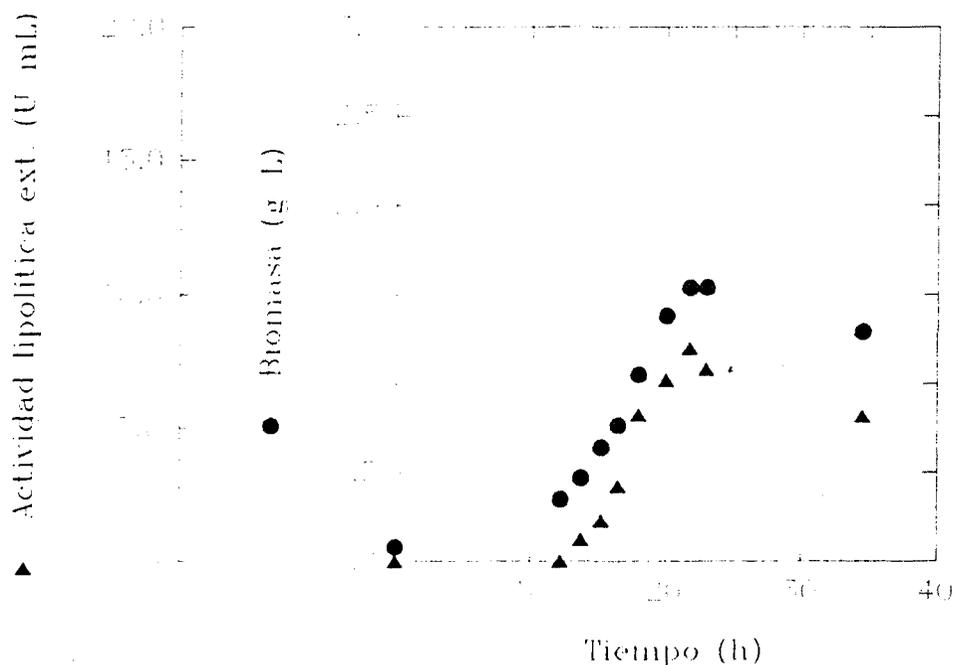


Figura 4.11. Fermentación en discontinuo 2 g/L Oleico.

Con el objetivo de mejorar la producción de lipasas y también de evitar la formación de la emulsión se efectuó una fermentación en continuo con una concentración de urea de 2 g/L y 2 g/L de ácido oleico en el alimento. Las restantes condiciones de operación fueran las mismas que en el continuo de 8 g/L.

Como se puede observar en la figura 4.12 el comportamiento de la lipasa intracelular y extracelular fue similar, ambas aumentaron al principio de la operación en continuo, manteniéndose constantes durante unos dos tiempos de residencia, para posteriormente decrecer hasta niveles prácticamente indetectables, siete tiempos de residencia. La biomasa alcanzó los valores previstos al cabo de un tiempo de residencia, y se mantuvo constante hasta siete tiempos de residencia, pero cuando la lipasa ya no era detectable en el medio comenzó a disminuir su concentración.

Respecto a la observación microscópica hay que señalar que durante el crecimiento en discontinuo y el período inicial del continuo el microorganismo creció en agregados. Además, después de tres tiempos de residencia el porcentaje de células aisladas empezó a incrementar y alrededor de siete tiempos de residencia prácticamente todas las células estaban creciendo de forma aislada.



**Figura 4.12.** Fermentación en continuo utilizando ácido oleico (2 g/L) como fuente de carbono y urea (2 g/L) como fuente de nitrógeno.

En este experimento también se observó la formación de la emulsión, aproximadamente después de tres tiempos de residencia, aunque más débil que la que se producía en el continuo con 8 g/L de ácido oleico y 8 g/L de urea.

Desde el momento en que no fue posible resolver el problema de estabilidad operacional, se propusieron dos estrategias: Primera, estudiar la operación en semicontinuo, para investigar los efectos de la concentración de ácido oleico sobre el crecimiento celular y la producción de lipasas, intentado evitar la formación de la emulsión a base de limitar el tiempo de contacto entre la urea y una alta concentración de ácido oleico. Segunda, cambiar la fuente de nitrógeno y sustituirla por una sustancia inorgánica como el sulfato amónico, para evitar directamente el causante de los problemas operacionales.

#### **4.2.3. Fermentaciones en semicontinuo.**

En estos cultivos cada una de las fermentaciones fue dividida en dos fases. La primera fase o etapa consistía en una fermentación en discontinuo, utilizando el medio básico conteniendo 2 g/L de ácido oleico y 4 g/L de urea como fuente de nitrógeno. El volumen de fermentador ocupado era de 2 L. En la segunda etapa las velocidades de adición de fuente de carbono se fijaron en 2.4, 1.07, y 0.73 g/h, del mismo modo que se hiciera en las fermentaciones en continuo, hasta llegar a tener una cantidad de ácido oleico adicionado equivalente a 8, 4 y 3 g/L respectivamente para un experimento en discontinuo. El medio de cultivo en estos experimentos fue suplementado con 0.5 g/L de extracto de levadura y 0.2 mg/L de pantotenato cálcico, para evitar posibles deficiencias de nutrientes.

El caudal de alimentación de la solución mineral para todos los experimentos, fue de 0.2 L/h con un contenido de 8 g/L, 4 g/L y 4 g/L de urea respectivamente. El volumen final del semicontinuo fue de 5 L. En todos estos experimentos no se observó la formación de emulsión urea/oleico, probablemente debido a que la urea y el ácido oleico no estuvieron suficiente tiempo en contacto para ello. De esta manera se conseguía el objetivo de evitar su formación.

En la figura 4.13 se pueden observar los resultados de estas fermentaciones. En todas ellas la concentración de biomasa aumentó en proporción a la cantidad de ácido oleico consumido, con un rendimiento biomasa/substrato constante ( $Y_{vis} = 0.70$ ). Tanto la actividad lipolítica extracelular como la intracelular también aumentó pero la producción no fue proporcional a la cantidad de ácido oleico consumido.

Antes de sacar conclusiones sobre estos experimentos es importante comentar las oscilaciones que se producen en la lipasa extracelular, sobretodo cuando se tiene una cantidad de ácido oleico importante en el medio. Según estudios complementarios, se comprobó que la lipasa tenía la propiedad de adsorción en la fase orgánica, de manera que siempre que existiera ácido oleico en el medio, dado que el análisis tan sólo medía lipasa en fase acuosa, se tendría una medida de la actividad menor que la real. Esta propiedad, acompañada del hecho de trabajar en semicontinuo, en que el volumen del fermentador está cambiando, y por tanto el número de palas de agitación, haría que la lipasa extracelular medida bajara drásticamente cada vez que el volumen del fermentador llegara al nivel de un nuevo propulsor. Esto es debido a que la adsorción depende de la superficie interfacial disponible, que será función de la eficacia de la agitación, la cual mejora al aumentar el número de palas o propulsores.

No obstante, si se tiene en cuenta este fenómeno, se pueden igualmente interpretar los resultados en semicontinuo y comparar productividades, rendimientos, etc..., ya que no son puntuales sino finales. Estos resultados sugieren que, si la velocidad de alimentación del ácido oleico se mantiene por debajo de la velocidad máxima de consumo, la concentración de substrato está siempre por debajo de cierto límite, lo que permite obtener una mayor productividad y rendimiento de lipasas. Aunque la producción y excreción de la lipasa deba ser inducida por el ácido oleico, la excesiva concentración de este ácido disminuye, y hasta incluso suprime, la producción de lipasas. Esto se puede observar en la figura 4.13. En la figura 4.13a, correspondiente a la mayor velocidad de adición de substrato, podemos observar que a partir del valor máximo de lipasa (extra e intra), prácticamente se para la producción, ya que al realizar el balance de materia entre este punto y el valor final, la variación de concentración corresponde al efecto de dilución.

De los resultados obtenidos se puede deducir que existe un rango óptimo de concentración de ácido oleico para la producción de lipasas. De este modo, cuando se trabaja en estas condiciones de operación la producción se mejoró, pero no obstante el problema de estabilidad operacional relacionado con el cultivo en continuo no había sido resuelto. Por ello se planteó la necesidad de eliminar los agentes responsables de la producción de estos problemas operacionales. Como ya se había seleccionado la fuente de carbono (ácido oleico), la alternativa era cambiar la fuente de nitrógeno utilizada (urea) por otra, por ejemplo de tipo inorgánico.

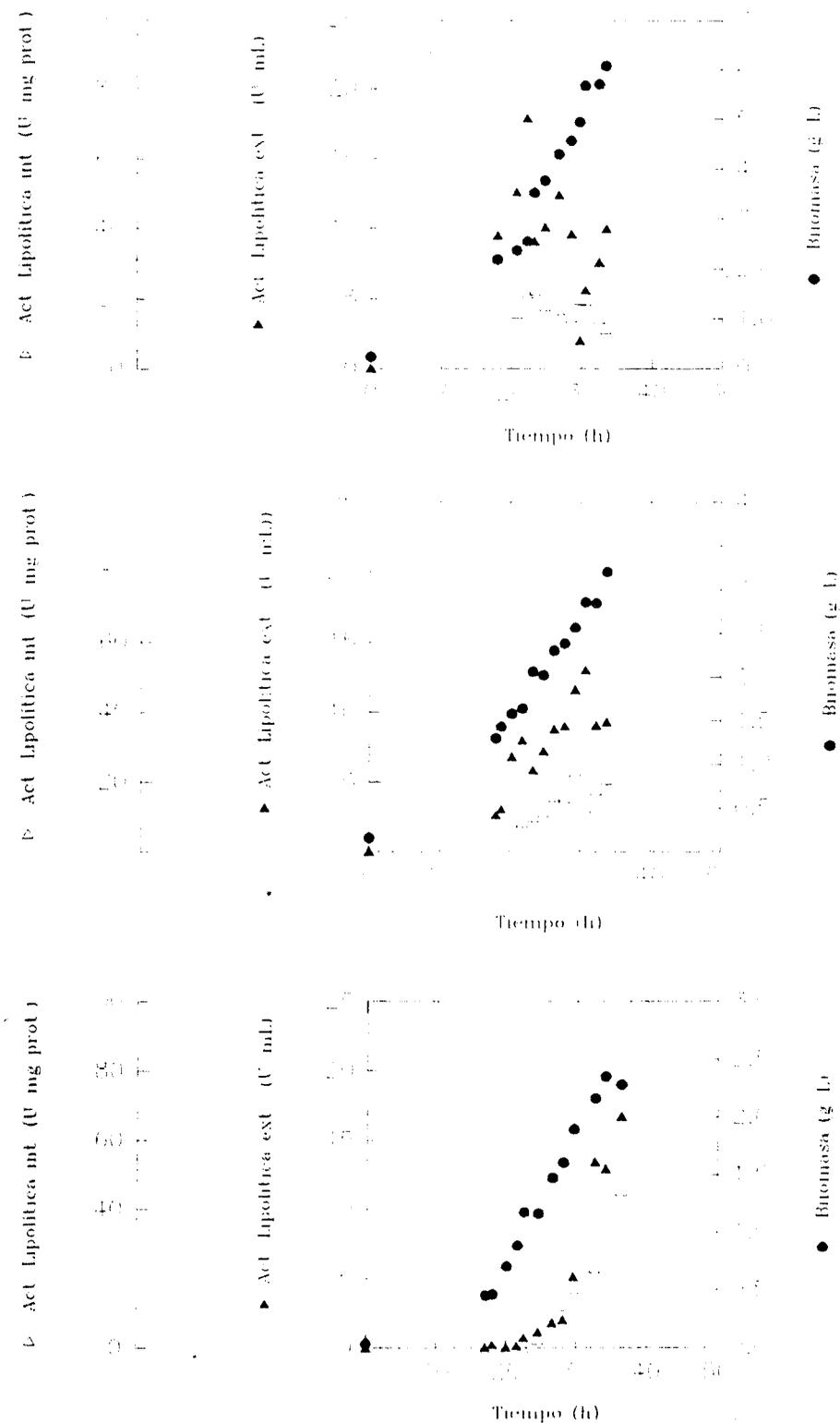


Figura 4.13. Serie de 3 figuras correspondientes a los experimentos realizados en semicontinuo.

#### 4.2.4. Fermentaciones en discontinuo.

De los experimentos realizados en modo continuo se elaboró la hipótesis de que la disminución del porcentaje de nitrógeno en *Candida rugosa* era debida a la producción de una emulsión urea/oleico. Para investigar esta hipótesis se realizaron diferentes experimentos utilizando sulfato amónico como fuente de nitrógeno inorgánica.

Primeramente se incubó el medio mineral que contenía ácido oleico y sulfato amónico, ambos a 8 g/L y 30 °C, con una agitación de 500 rpm, durante 4 días sin observarse la formación de emulsión. Para conocer si la producción de lipasas se veía afectada por el cambio de la fuente de nitrógeno, se llevaron a cabo fermentaciones en discontinuo con diferentes concentraciones de ácido oleico y sulfato amónico.

En la figura 4.14 se muestra la evolución de un crecimiento de *Candida rugosa* utilizando 2 g/L de ácido oleico y 4 g/L de sulfato amónico. El comportamiento general fue el mismo que cuando se había utilizado urea como fuente de nitrógeno. El rendimiento en biomasa fue ligeramente mayor ( $Y_{x/s} = 0.85$ ) que con urea, obteniéndose una producción de lipasas similar.

A pesar de haber comprobado que en el proceso en discontinuo no había grandes diferencias al cambiar la fuente de nitrógeno, era necesario tener un conocimiento más profundo del sistema de

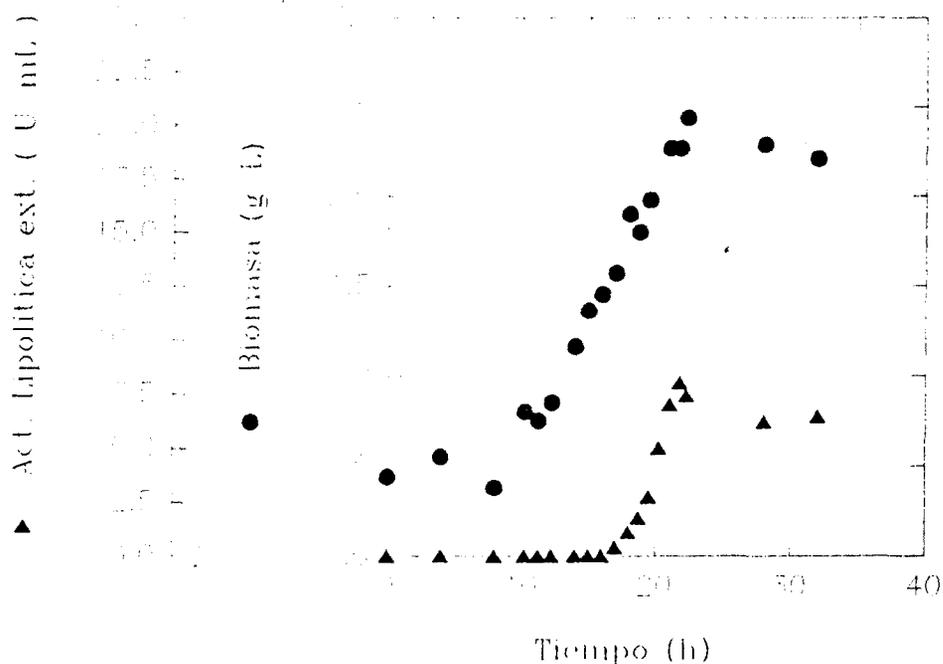


Figura 4.14. Fermentación en discontinuo 2 g/L oleico y 4 g/L de sulfato amónico.

producción del enzima, para poder ser aplicado posteriormente en la optimización de una producción en continuo.

Uno de los principales objetivos que se planteó entonces fue el de estudiar el efecto de la concentración de ácido oleico, como variable a optimizar para conseguir mejores rendimientos en la producción del enzima. Este estudio se realizó con fermentaciones en discontinuo, con las siguientes concentraciones iniciales de ácido oleico: 0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 4 g/L y 8 g/L. Debido al hecho de cambiar la fuente de nitrógeno el medio ya no estaba tan fuertemente tamponado, ya que la urea ya no ejercía su efecto tamponador. Por ello se introdujo un control de pH, utilizando  $(\text{NH}_4)\text{OH}$  1M para mantener en todo momento el pH del medio de cultivo en un valor de 6.3.

Igualmente, en cada experimento se realizaba el seguimiento en línea de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  (CER), a partir de los cuales se calculaba el coeficiente respiratorio (RQ) indicador indirecto de la actividad del microorganismo.

#### ***Fermentación en discontinuo con 0.5 g/L de ácido oleico***

Las composiciones del medio de cultivo y del inóculo fueron ya descritas en el capítulo de materiales y métodos, excepto la concentración de ácido oleico y sulfato amónico que eran variables en cada experimento.

En esta fermentación las composiciones del inóculo eran las siguientes:

- concentración de ácido oleico en el inóculo: 1 g/L
- concentración de sulfato amónico en el inóculo : 1 g/L

La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en el medio era de 1 g/L y el caudal de aireación se mantuvo constante en 0.25 l/min suficiente para mantener la concentración del oxígeno disuelto por encima del 20% de saturación en esas condiciones. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla A 4.2 del apéndice.

La evolución de los parámetros se presenta en las gráficas 4.15 y 4.16

#### ***Fermentación en discontinuo con 1 g/L de ácido oleico.***

Composición del inóculo:

- concentración de ácido oleico : 2 g/L.
- concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4 g/L.

La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del medio era de 4 g/L y el caudal de aire suministrado era de 0.5 L/min. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla A 4.3 del apéndice y la evolución de los parámetros de la fermentación se muestra en las figuras 4.17 y 4.18.

*Fermentación en discontinuo con 2 g/L de ácido oleico.*

Composición del inóculo:

- concentración de ácido oleico: 2 g/L.
- concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4 g/L.

La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del medio era de 4 g/L y el caudal de aire suministrado era de 0.50 l/min. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla A 4.4 del apéndice y la evolución de los parámetros se presenta en las figuras 4.19 y 4.20.

*Fermentación en discontinuo con 4 g/L de ácido oleico.*

Composición del inóculo:

- concentración de ácido oleico: 2 g/L.
- concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4 g/L.

La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del medio era de 8 g/L y el caudal de aire suministrado era de 1 l/min. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla A 4.5 del apéndice y la evolución de los parámetros se presenta en las figuras 4.21 y 4.22.

*Fermentación discontinua con 8 g/L de ácido oleico.*

Composición del inóculo:

- concentración de ácido oleico: 2 g/L
- concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 4 g/L.

La concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  del medio era de 4 g/L y el caudal de aire suministrado era de 3.0 l/min. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla A 4.6 del apéndice y la evolución de los parámetros se presenta en las figuras 4.23 y 4.24.

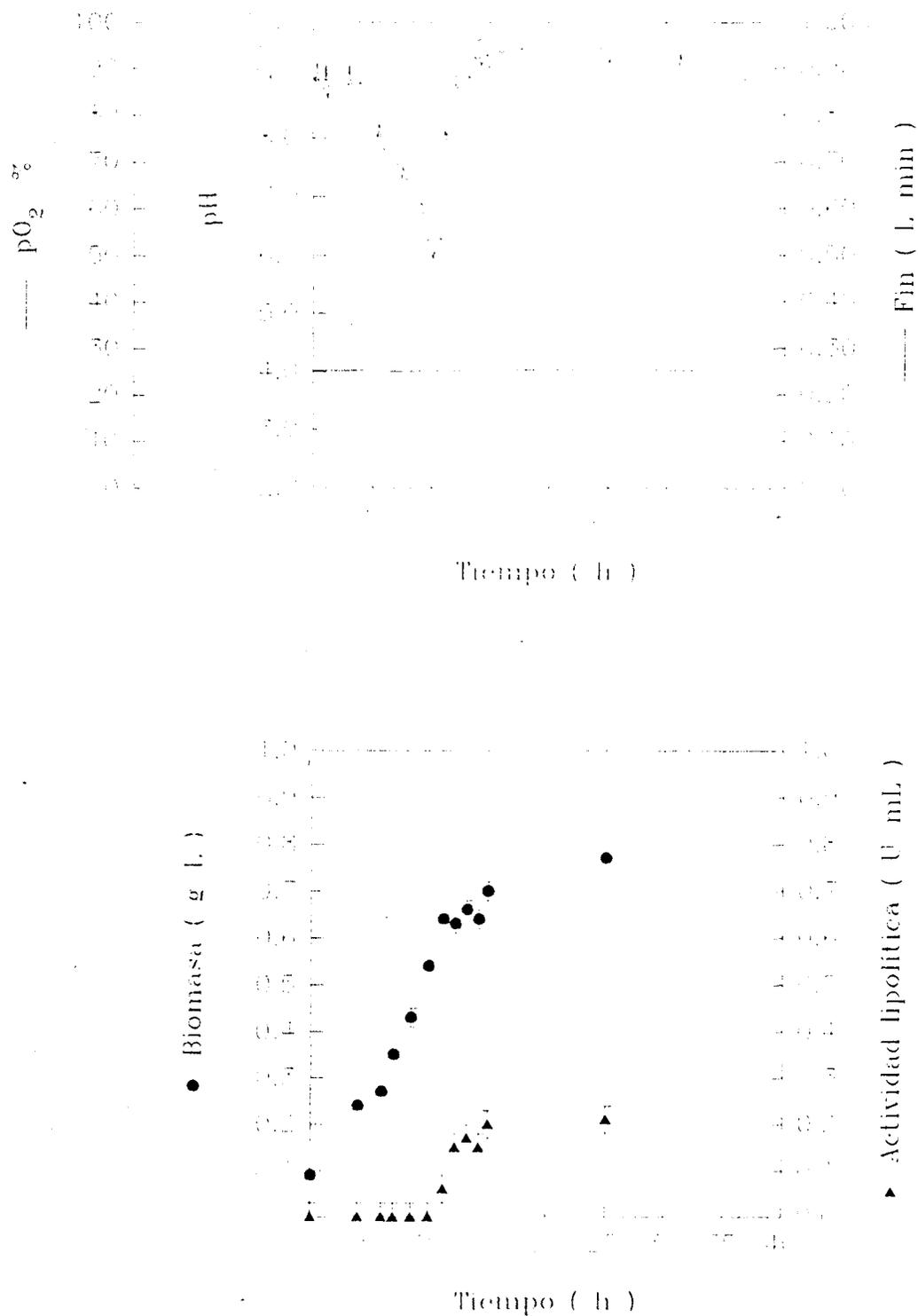


Figura 4.15. Evolución de los parámetros experimentales en una fermentación en discontinuo de 0.5 g/L de ácido oleico.

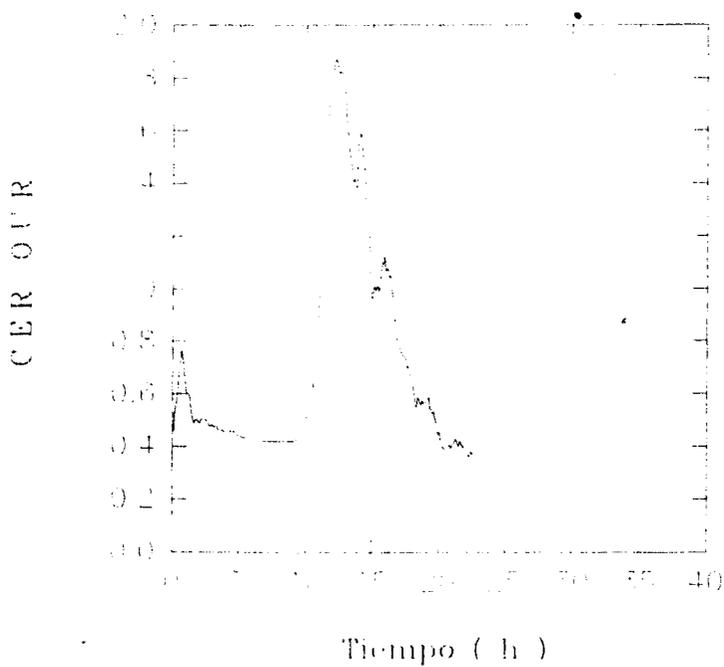
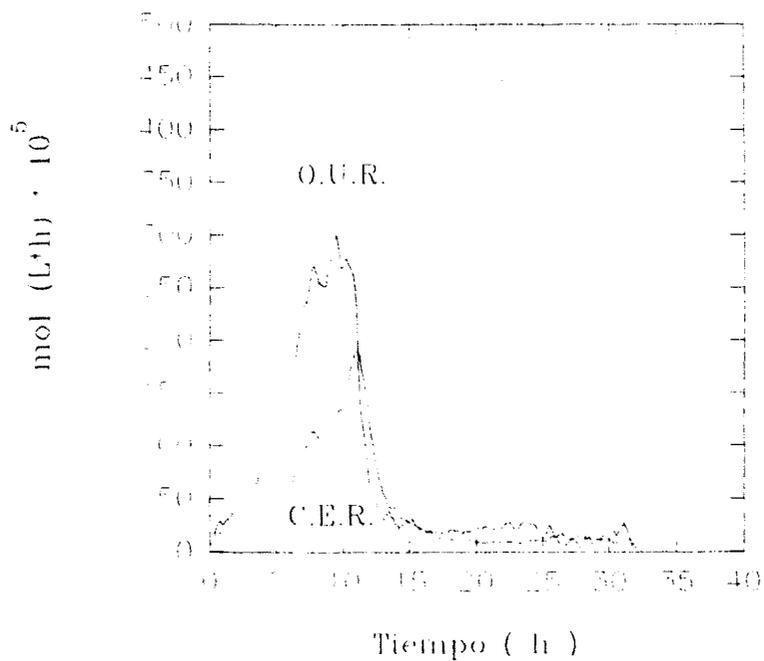


Figura 4.16. Evolución de los parámetros CER, OUR y RQ en una fermentación en discontinuo de 0.5 g/L de ácido oleico.

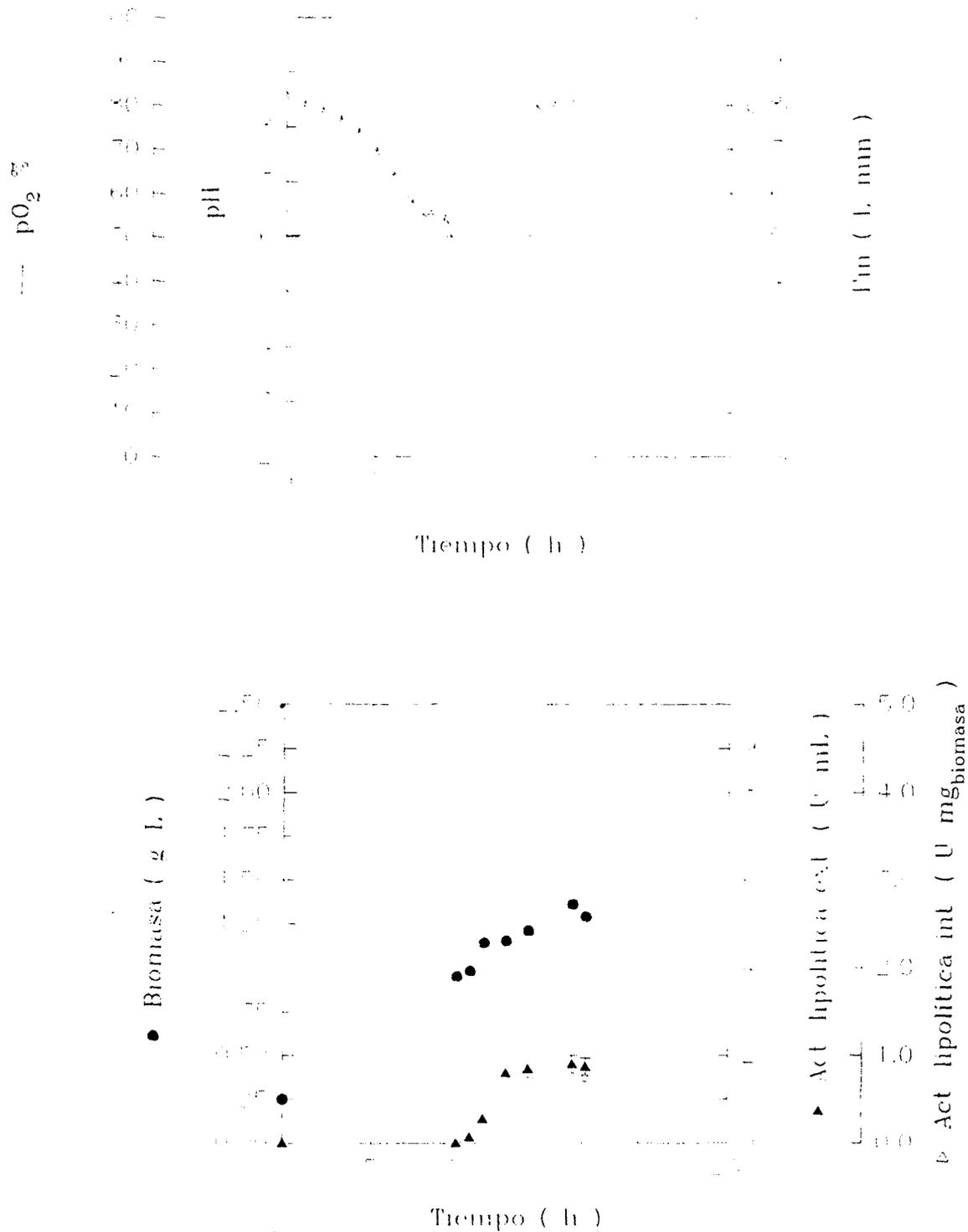


Figura 4.17. Evolución de los parámetros experimentales de una fermentación en discontinuo de 1 g/L de ácido oleico.

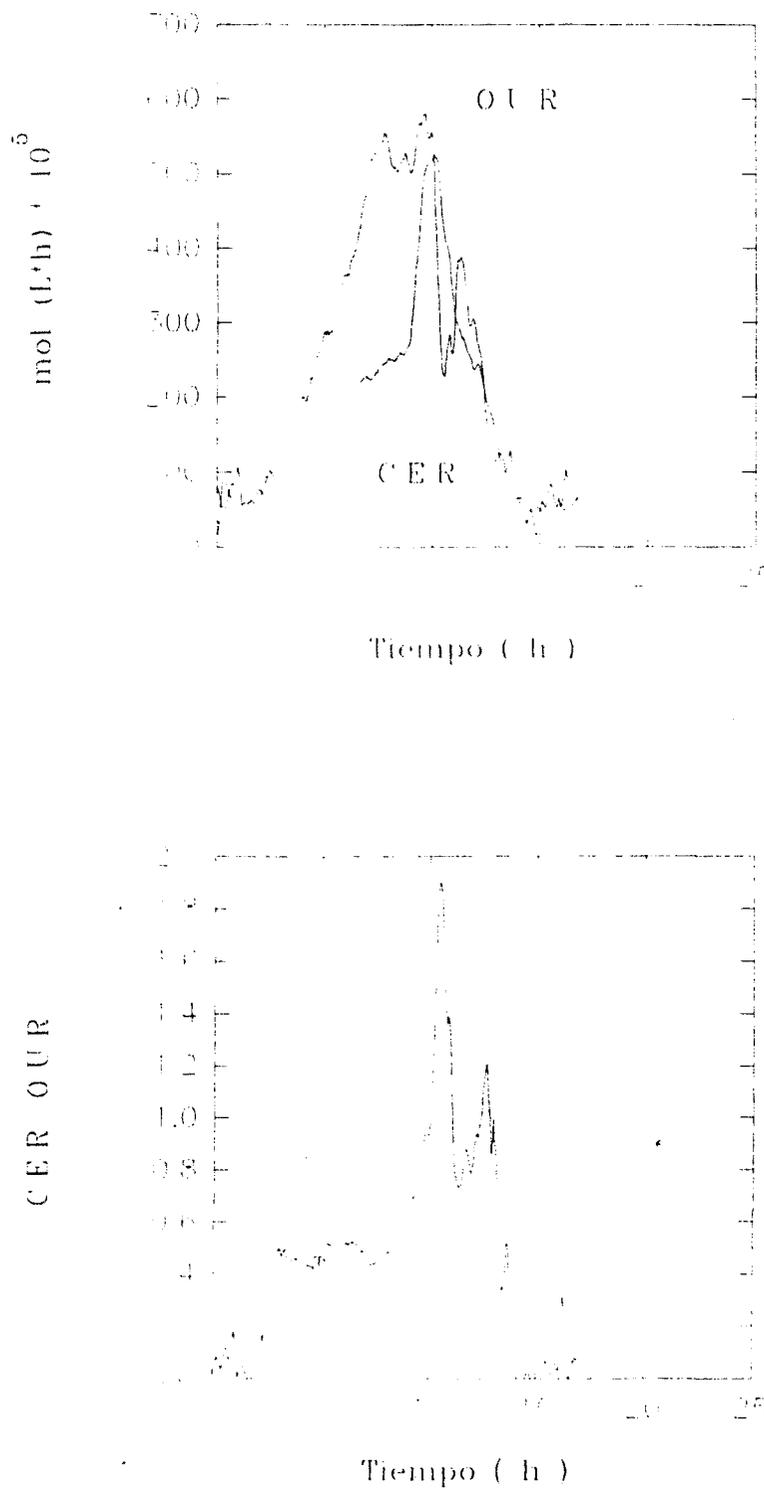
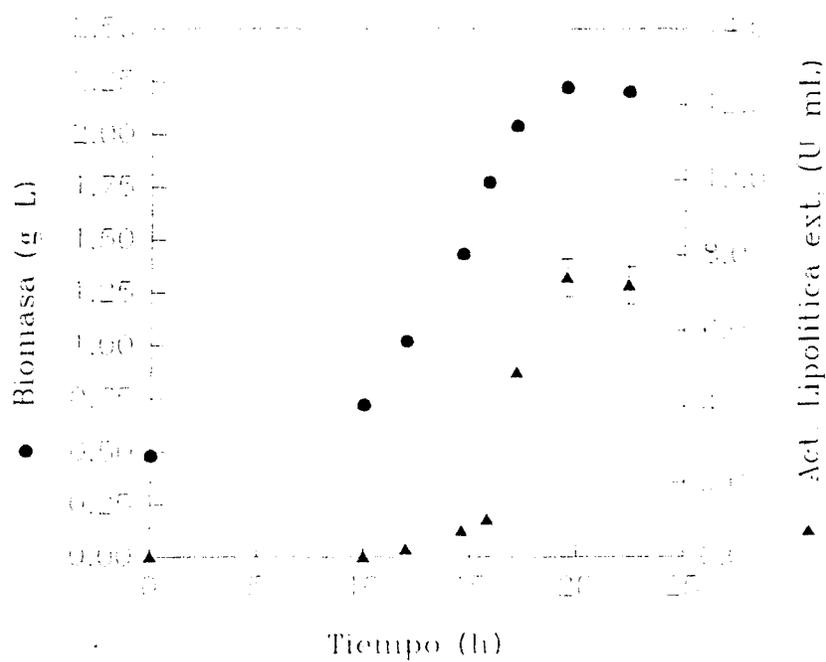
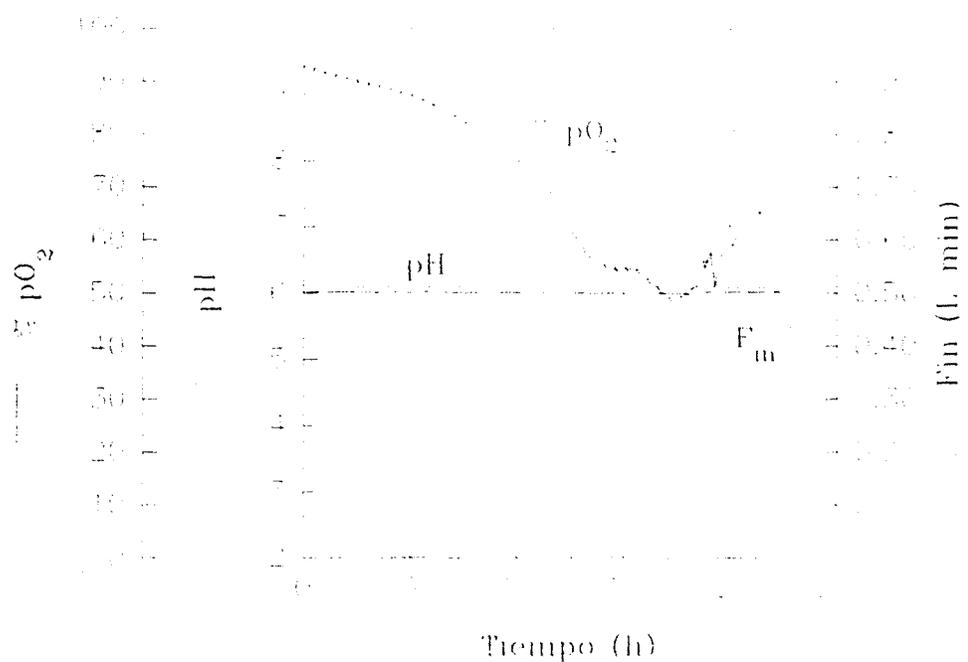


Figura 4.18. Evolución de los parámetros CER, OUR y RQ en una fermentación discontinua de 1 g/L de ácido oleico.



**Figura 4.19.** Evolución de los parámetros experimentales de una fermentación en discontinuo de 2 g/L de ácido oleico.

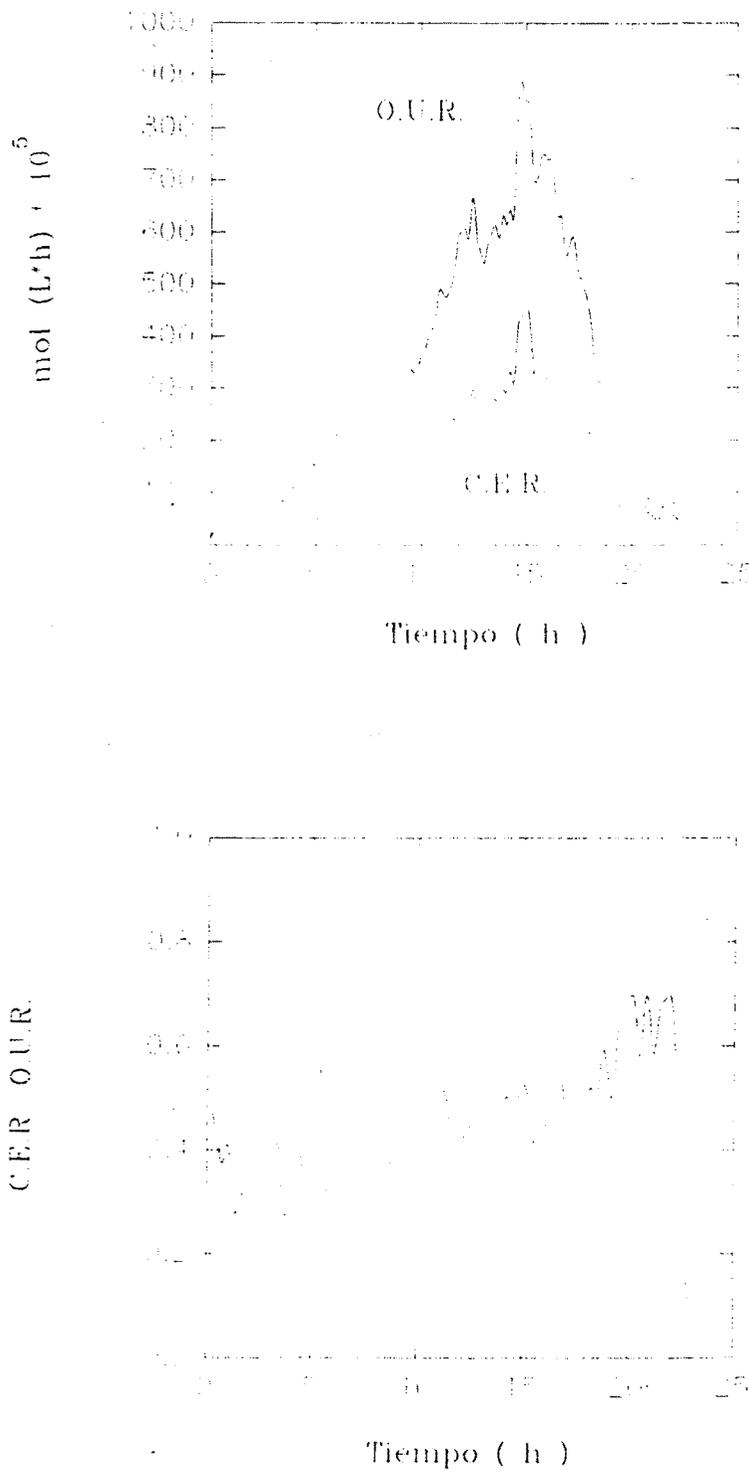
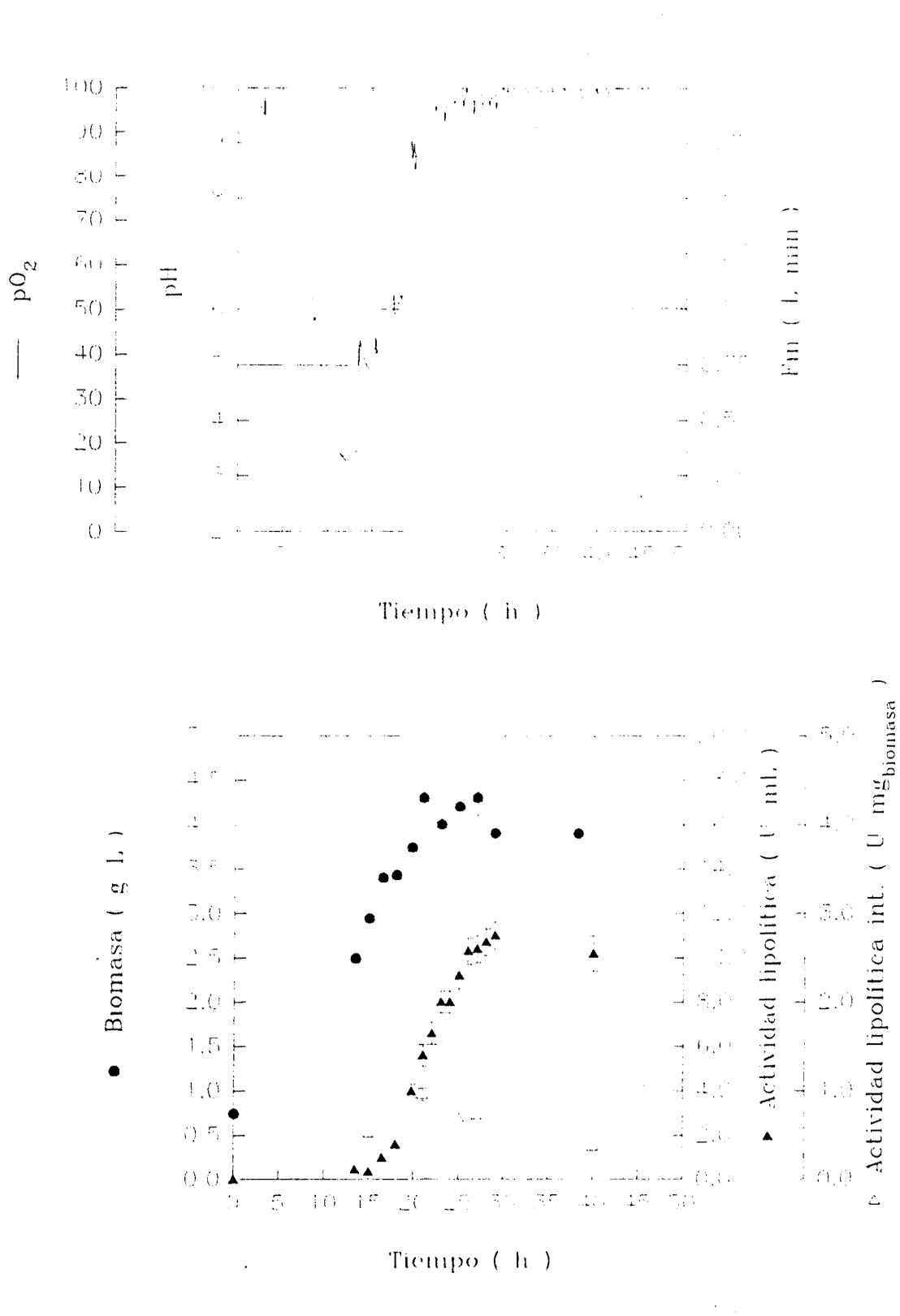


Figura 4.20. Evolución de los parámetros CER, OUR y RQ en una fermentación en discontinuo de 2 g/L de ácido oleico.



**Figura 4.21.** Evolución de los parámetros experimentales en una fermentación en discontinuo de 4 g/L de ácido oleico.

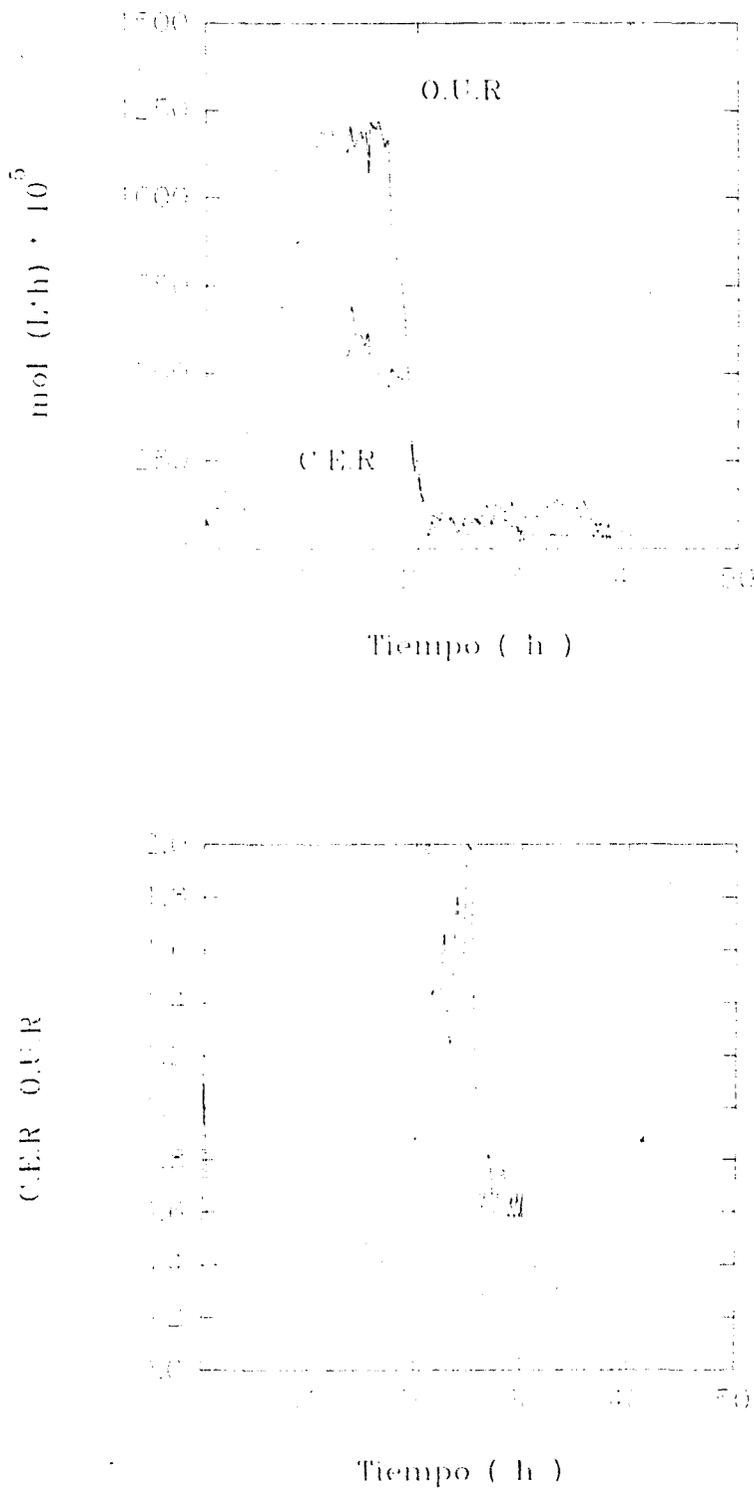
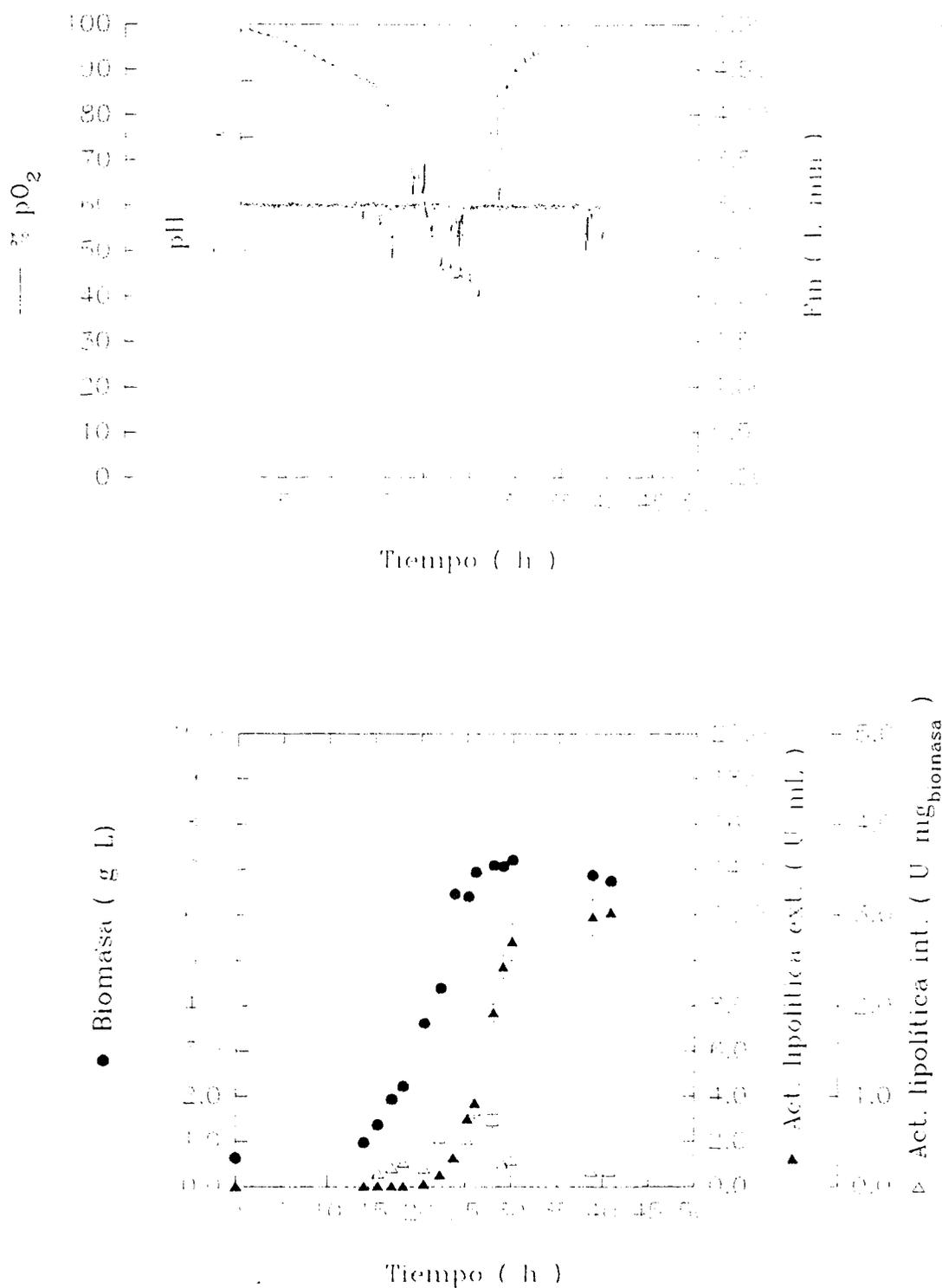


Figura 4.22. Evolución de los parámetros CER, OUR y RQ en una fermentación en discontinuo de 4 g/L de ácido oleico.



**Figura 4.23.** Evolución de los parámetros experimentales en una fermentación en discontinuo de 8 g/L de ácido oleico.

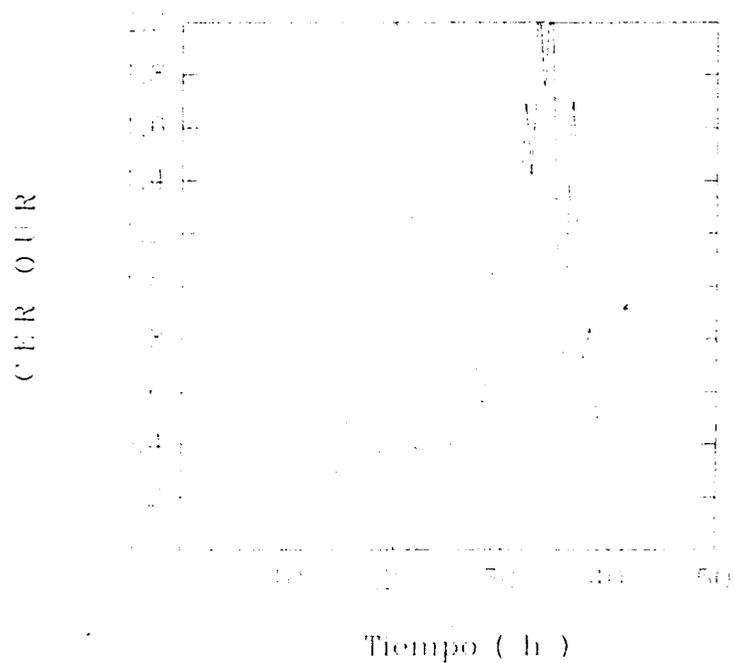
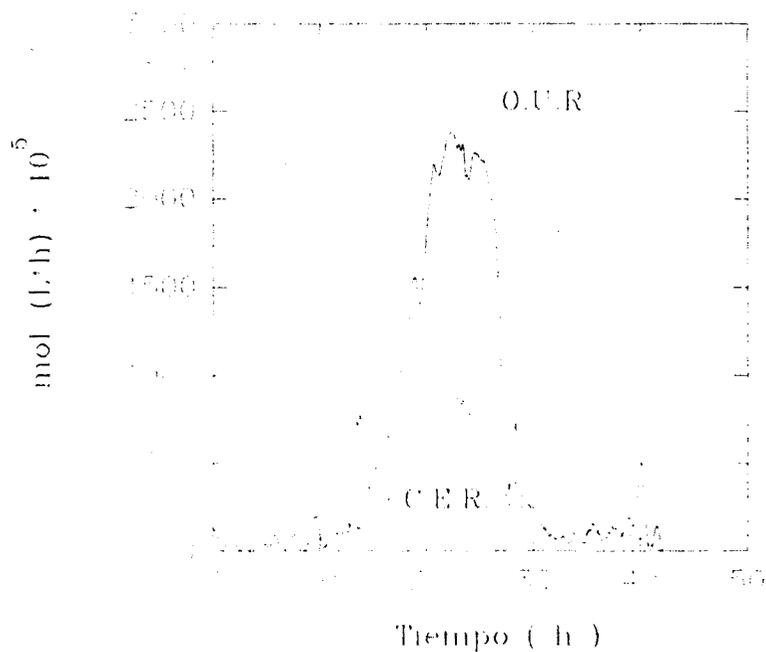


Figura 4.24. Evolución de los parámetros CER, OUR y RQ en una fermentación en discontinuo de 8 g/L de ácido oleico.

El hecho de trabajar con un sistema en el cual el medio de cultivo está compuesto por fase acuosa y orgánica, comporta una serie de problemas de operación adicionales. Como ejemplo de ello se puede mencionar la poca repetitividad, en todos los experimentos, de la edad y tamaño del inóculo, debido a la falta de disponibilidad de una medida de la concentración de biomasa en el momento de realizar la inoculación. Esto provoca que experimentos de las mismas características y condiciones experimentales, no den exactamente los mismos resultados, ya que hay una variación en el período de latencia, en función del inóculo utilizado, del tiempo de fermentación, interacción biomasa/sustrato, etc...

Por este motivo, la cantidad de sustrato consumido por el microorganismo no será tan sólo la dada por la concentración de ácido oleico inicial en el biorreactor. En función de la concentración de ácido oleico en el inóculo y del crecimiento de éste, en el momento de inocular el fermentador, se puede producir un aumento de la concentración inicial de ácido oleico, al tener en cuenta el que no ha sido consumido por el inóculo.

Los parámetros característicos de cada fermentación se presentan en la tabla 4.2.

[ácido oleico]	$S_{total}$	$X_f$	$P_f$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$\mu_{max}$
0.5 g/l	0.60	0.72	0.21	1.20	0.35	0.29	0.16
1 g/l	1.20	1.29	1.80	1.075	1.50	1.40	0.15
2 g/l	2.20	2.20	7.20	1.00	3.27	3.27	0.15
4 g/l	4.20	4.01	10.5	0.955	2.50	2.62	0.15
8 g/l	8.20	7.30	12.10	0.890	1.48	1.66	0.16

Tabla 4.2

El problema de considerar todo el sustrato aportado, incluso por el aportado al inocular como sustrato no consumido por el inóculo, es que probablemente los rendimientos para la fase en fermentador e inóculo no sean iguales, por lo que se estará cometiendo un error más o menos importante (sobre todo en los experimentos a concentraciones iniciales bajas de ác. oleico).

Si tan sólo se tiene en cuenta el sustrato aportado al fermentador, sin tener en cuenta que la pequeña fracción que acompaña al adicionar inóculo, se tendrán los resultados de la tabla 4.3.

Resultados que se han considerado de mayor fiabilidad a la hora de interpretar los experimentos.

[ácido oleico]	$S_{\text{inicial}}$	$X_f$	$X_f - X_0$	$P_f$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$\mu_{\text{max}}$
0.5 g/l	0.50	0.72	0.62	0.21	1.24	0.42	0.34	0.16
1 g/l	1.00	1.29	1.02	1.80	1.02	1.80	1.76	0.15
2 g/l	2.00	2.20	1.72	7.20	0.86	3.60	4.19	0.15
4 g/l	4.00	4.01	3.37	10.5	0.843	2.62	3.12	0.15
8 g/l	8.00	7.30	6.67	12.1	0.834	1.51	1.81	0.16

Tabla 4.3.

S: substrato (g/L)

$X_0$ : biomasa inicial (g/L)

$X_f$ : biomasa final (g/L)

$P_f$ : lipasa final (U/mL)

$Y_{X/S}$ : rendimiento biomasa/substrato (g biomasa seca/g ácido oleico)

$Y_{P/S}$ : rendimiento producto/substrato (U lipasa/g ácido oleico)

$Y_{P/X}$ : rendimiento producto/biomasa (U lipasa/ g biomasa seca)

El valor del rendimiento  $Y_{X/S}$  se mantiene constante, alrededor de un valor de 1.00 para concentraciones iniciales de ácido oleico bajas, y sobre un valor de 0.84 para el resto de concentraciones superiores. En cambio, los rendimientos  $Y_{P/S}$  y  $Y_{P/X}$  son variables, dependiendo de la concentración inicial de substrato.

En la figura 4.25 se puede observar la evolución de los rendimientos  $Y_{P/S}$  y  $Y_{P/X}$  en función de la concentración inicial de substrato. Se observa que existe un aumento de los valores del rendimiento hasta una concentración inicial de 2 g/L de ácido oleico, para la que se llega al máximo, para disminuir posteriormente. El máximo para los dos rendimientos, se encuentra sobre el mismo valor de concentración inicial de ácido oleico, por lo que se podría decir que el valor óptimo para la concentración inicial sería de 2 g/L.

Estos resultados indican que existe un aumento de la velocidad de producción del enzima,

hasta una concentración de ácido oleico óptima, a partir de la cual la velocidad disminuye, sugiriendo una posible inhibición de la producción debida al exceso de sustrato.

A partir de la evolución de los parámetros CER y OUR, y el cociente CER/OUR para cada una de las fermentaciones, se observa una variación brusca del valor del cociente respiratorio al final del cultivo, que llega en algunas ocasiones a multiplicarse por factores del orden de 4 ó 5 veces, como es el caso de las fermentaciones de 0.5 g/L y 8 g/L de sustrato.

Este aumento drástico y súbito del cociente respiratorio, podría deberse a un cambio en el comportamiento respiratorio del microorganismo, de manera que la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), disminuye más rápidamente que la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (CER). Esta variación en el comportamiento respiratorio coincide, prácticamente en todas las fermentaciones realizadas, con el inicio de la aparición de la lipasa extracelular en el medio acuoso, y el principio de la fase estacionaria. El aumento del cociente respiratorio sería una indicación de que existe un cambio en la actividad metabólica del microorganismo (Kiss et al. 1991).

En las fermentaciones de 1 g/L, 4 g/L y 8 g/L de ácido oleico, en las que se ha realizado la medida de la actividad lipolítica intracelular, se puede observar que se produce un máximo de concentración del enzima dentro de la levadura. Este hecho se puede explicar, pensando en la producción y acumulación intracelular de la lipasa, hasta unos determinados niveles, a partir de los cuales tiene lugar la excreción del enzima al medio, produciéndose una disminución de la actividad lipolítica dentro de la célula. Este descenso estaría causado igualmente por una disminución en la relación velocidad de síntesis/velocidad de excreción por parte del microorganismo, al menos en la última fase del crecimiento.

De este modo se observa que, al menos durante la mayor parte de la fermentación, el paso limitante (velocidad más lenta) sería la excreción al medio del enzima y no la síntesis del enzima, dado que la actividad lipolítica intracelular a niveles importantes es previa a la extracelular, y esta variación no puede ser justificada por los posibles fenómenos de adsorción del enzima en las interfases orgánica/acuosa.

Finalmente, habría que comentar que la concentración inicial de sustrato, tan solo tiene influencia sobre la producción de lipasas, y no sobre el crecimiento del microorganismo, ya que la velocidad específica máxima de crecimiento alcanzada se mantiene alrededor de 0.15 h<sup>-1</sup> para todas las fermentaciones.

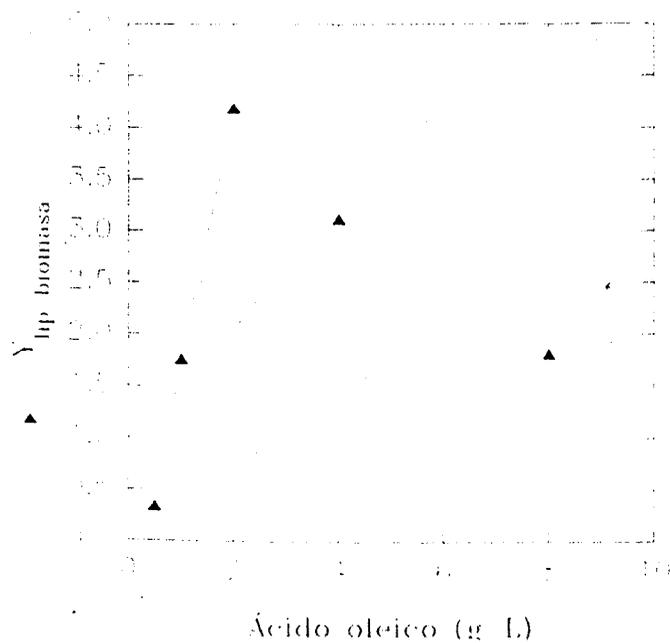
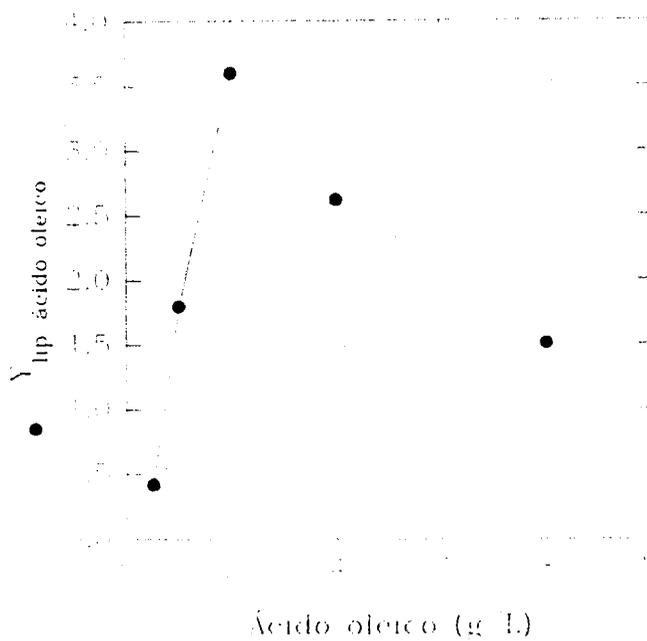


Figura 4.25. Rendimientos de biomasa/substrato y lipasa/substrato en función del ácido oleico inicial.

#### 4.2.5. Fermentaciones en continuo II.

En todos los experimentos que se llevaron a cabo en modo continuo, utilizando ácido oleico y urea, fue imposible mantener la producción de lipasas constante a lo largo de la fermentación. Para poder elucidar si la parada en la producción de lipasas era debida a una deficiencia de nitrógeno, como consecuencia de la formación de la emulsión urea/oleico, se llevaron a cabo una serie de fermentaciones en continuo utilizando sulfato amónico como fuente de nitrógeno.

Las condiciones de operación fueron las mismas que las realizadas en los cultivos previos con urea, excepto que en la primera fase, cuando se realiza un cultivo en semicontinuo, el medio contenía 2 g/L de ácido oleico con 4 g/L de sulfato amónico. El medio mineral más el sulfato amónico (4 g/L) fue adicionado a una velocidad de dilución de  $D=0,06 \text{ h}^{-1}$ . El ácido oleico se adicionó separadamente para conseguir una concentración de 2 g/L en la corriente de entrada.

Como puede verse en la figura 4.26 la lipasa extracelular aumentó al principio de la operación en continuo, alcanzando un máximo entre 1 y 2 tiempos de residencia. Después de 3 tiempos de residencia la actividad decreció hasta el nivel obtenido en el cultivo en discontinuo, alcanzándose un estado estacionario alrededor de los 4 tiempos de residencia. Este estado estacionario se mantuvo durante 5 tiempos de residencia. La concentración de biomasa que se obtuvo fue prácticamente la del estado estacionario, una vez transcurrido tan sólo 1 tiempo de residencia, y se mantuvo constante hasta el final del experimento.

Respecto al porcentaje de nitrógeno en la fórmula estequiométrica de *Candida rugosa*, hay que mencionar que no cambió durante la fermentación. La observación microscópica mediante contraste de fases, mostró que el microorganismo crecía en agregados todo el experimento y que no se llegaban a observar acumulaciones lipídicas. Además de todo esto no fue detectada la formación de algún tipo de emulsión.

Estos resultados sugieren que la inaccesibilidad de la fuente de nitrógeno por parte del microorganismo, fue debida a la formación de una emulsión cuando se usó urea como fuente de nitrógeno y que el descenso de la producción de lipasas y por tanto el fenómeno de lavado en los procesos en continuo fue también consecuencia de la emulsión.

De este modo, una vez cambiada la fuente de nitrógeno, se consiguieron resolver los problemas operacionales al trabajar en modo continuo. A pesar de no ser capaces de poder explicar los aspectos genéticos y bioquímicos de la regulación de la síntesis de lipasas, se puede sospechar que el incremento de la lipasa extracelular en el proceso de arranque de la operación en continuo, es un

fenómeno transitorio incontrolable que no puede ser explicado hasta el momento.

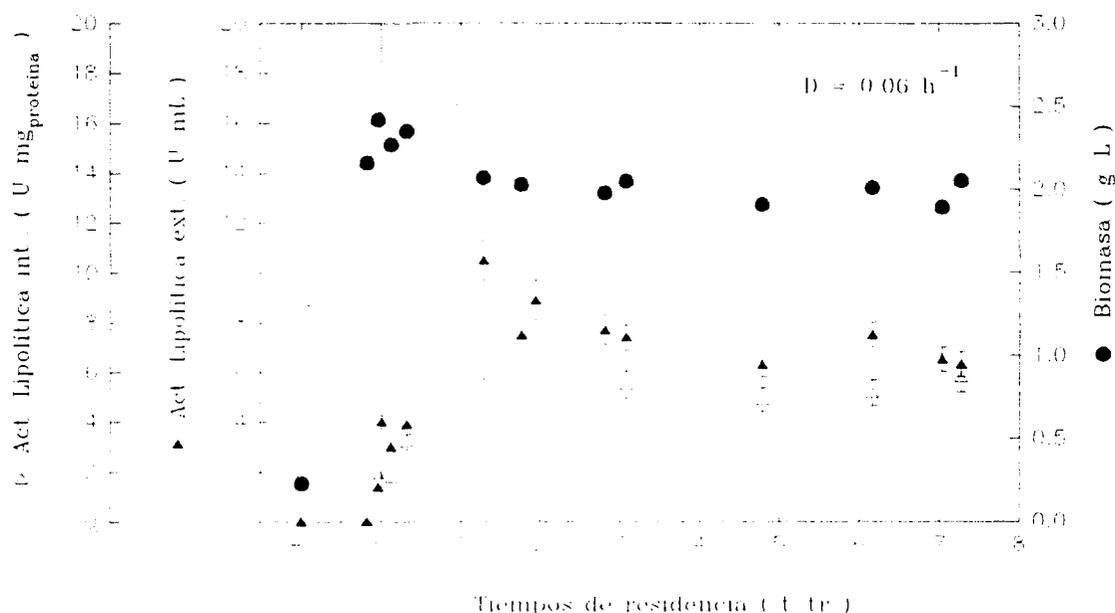


Figura 4.26. Fermentación en continuo con 2 g/L de ácido oleico y 4 g/L de sulfato amónico.

#### *Efecto de la frecuencia de adición del sustrato.*

Debido a la forma de alimentar el sustrato, ésta se habrá de tener en cuenta a la hora de definir las condiciones de operación del biorreactor en continuo. Tal como se describió en el apartado de materiales y métodos la adición del ácido oleico se hace separadamente del medio mineral. De esta manera la velocidad de dilución viene dada por la velocidad de alimentación del medio mineral, la concentración de sustrato a la entrada del reactor por la velocidad de dilución y por los g/h aportados por el sistema de adición del sustrato.

El sistema de adición de sustrato consta de una microbureta automática, comandada por ordenador vía RS232, de forma que al fijar el volumen y frecuencia de adición se consigue una velocidad determinada en g/h de suministro de sustrato. Dado que esta adición no es en forma continua sino discreta, se pensó conveniente el realizar un estudio sobre la frecuencia de adición, para evitar problemas de situaciones pseudotransitorias debido a que la alimentación no es estrictamente continua.

El objetivo de este estudio era el encontrar un valor límite o crítico a partir del cual la variación de la frecuencia de adición, en este caso aumento de frecuencia, no afectara a los resultados en estado estacionario. Para ello se fijó la velocidad de dilución y la concentración efectiva de sustrato a la entrada del fermentador, y se fue aumentando la frecuencia de adición hasta el límite que la propia microbureta permitía. Este límite viene dado por el volumen mínimo que la microbureta es capaz de dispensar con cierta garantía (50  $\mu\text{l}$  aproximadamente).

Se definieron dos variables adimensionales para poder determinar cuánto se aproximaba a la idealidad la adición de sustrato. La primera variable escogida fue el cociente entre el período de adición y el tiempo de residencia  $V_1 = p * D$  y la segunda fue el producto entre la frecuencia de adición y la velocidad específica máxima de crecimiento  $V_2 = p * \mu_{\text{max}}$ .

Tal como se puede deducir de la observación de estas dos variables adimensionales  $V_1$  tiene una relación directa con la hidráulica del biorreactor y  $V_2$  con la parte cinética. Si se consiguen mantener estas dos variables por debajo de un nivel límite, aumentando la frecuencia de adición, se podrá asegurar que la alimentación no se aleja mucho de una situación ideal en continuo. El sistema ideal tendría unos valores de  $V_1$  y  $V_2$  que tenderían a 0.

De esta forma por ejemplo en el experimento en continuo anteriormente presentado se trabajó a unos valores de  $V_1 = 0.015$  y  $V_2 = 0.04$ , ya que el período de adición fue de 15 min y la velocidad de dilución empleada de  $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$ .

Para observar los efectos de la frecuencia de adición del sustrato se realizó un experimento en el cual a una velocidad de dilución fija ( $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$ ) se fue cambiando la frecuencia de adición hasta el valor máximo permitido por la microbureta (frecuencia correspondiente a 50  $\mu\text{l}$  por adición aprox.). De este modo tuvieron valores de  $V_1 = 0.045$ ,  $V_2 = 0.12$ , para una frecuencia,  $V_1 = 0.015$ ,  $V_2 = 0.04$  para otra y  $V_1 = 0.005$ ,  $V_2 = 0.0013$  para la máxima frecuencia posible.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4.27, en la que podemos observar que si bien el valor en estacionario de la biomasa es prácticamente constante para todas las frecuencias, no sucede lo mismo para los valores de la lipasa extracelular e intracelular. Se observa que el efecto del aumento de la frecuencia de adición es el mismo tanto para la lipasa intracelular como extracelular. La síntesis de lipasas se ve favorecida cuando se tiene una adición lo más continua posible de fuente de carbono, pasándose de obtener 2 U/mL de actividad extracelular a 11 U/mL.

En la figura 4.28 se pueden observar los resultados obtenidos respecto a las variables CER, OUR y RQ. Los valores no discrepan al variar la frecuencia de adición, si bien al disminuir bastante la frecuencia (aumentar el período de adición) se aprecian considerables oscilaciones tanto del

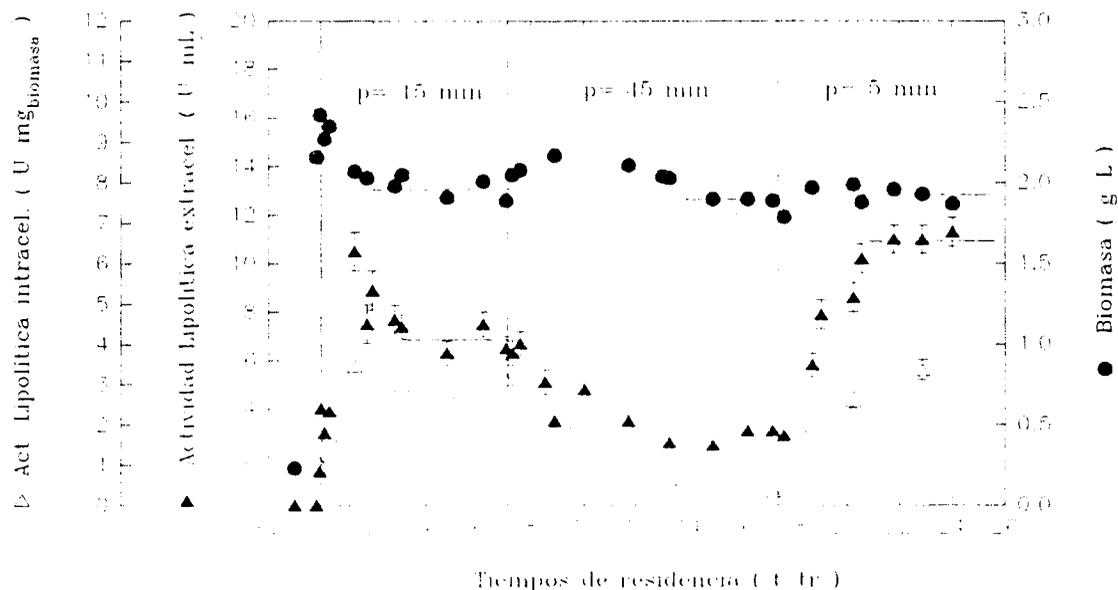


Figura 4.27. Fermentación en continuo mostrando el efecto de la frecuencia de adición de sustrato sobre la concentración de biomasa, y producción de lipasas.

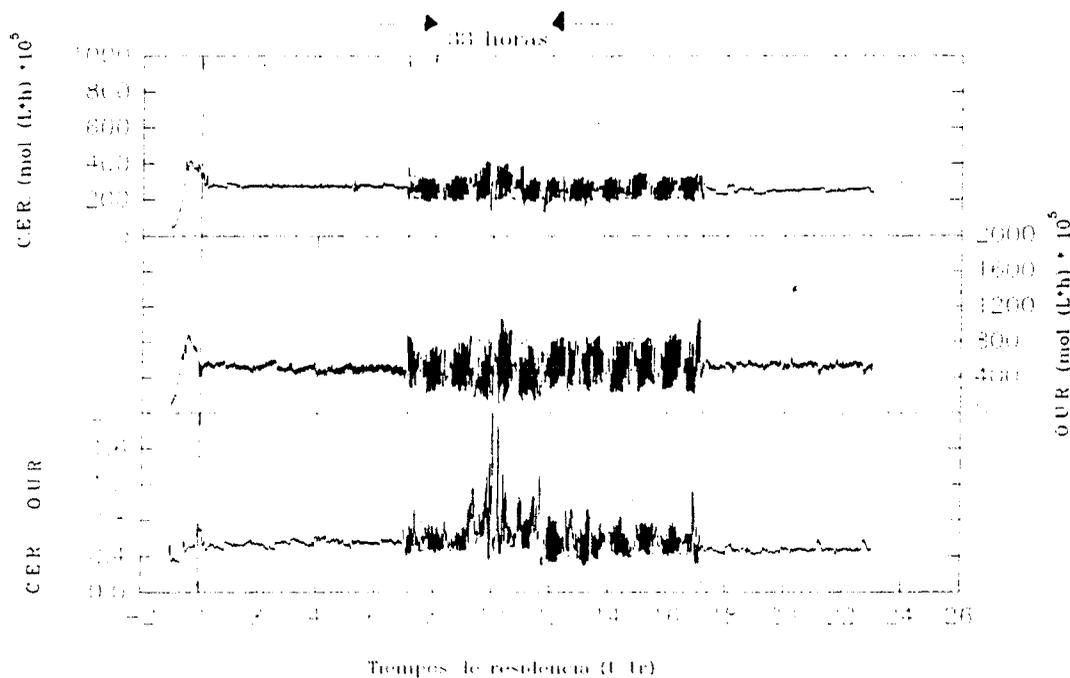


Figura 4.28. Fermentación en continuo mostrando el efecto de la frecuencia de adición de sustrato sobre la CER, OUR y el cociente respiratorio (RQ).

consumo de oxígeno como la producción de dióxido de carbono. Esto es debido a que el microorganismo consume el sustrato rápidamente, agotándose prácticamente entre adición y adición, cosa que no sucede si la alimentación se realiza cada menos tiempo y menos cantidad (frecuencia alta).

Por otra parte no se puede concluir que haya variación en la actividad metabólica, al menos de tipo respiratorio, del microorganismo cuando produce más o menos lipasas, ya que el coeficiente respiratorio es del mismo orden siempre que tenga suficiente sustrato. En los experimentos en discontinuo se observaba una variación del comportamiento respiratorio cuando se estaba agotando el sustrato y coincidía con un aumento en la velocidad de aparición de actividad lipolítica.

De este estudio se concluyó que la frecuencia de adición se tenía que fijar en su valor máximo, para garantizar siempre que no sería un factor que influyera negativamente en la producción. Para ello tan sólo es necesario fijar el volumen de adición en el volumen mínimo de unos 50  $\mu$ l y determinar el período de adición adecuado para, en función de la velocidad de dilución, mantener la concentración de ácido oleico deseada a la entrada del fermentador.

### *Influencia de la velocidad de dilución*

Una vez concretada la manera en la que se iba a realizar la adición de sustrato, a frecuencia máxima, se procedió a realizar los experimentos correspondientes para determinar la influencia que tenía la velocidad de dilución en la producción de lipasas.

Se estudió el efecto sobre la concentración de biomasa, actividad lipolítica extracelular, actividad lipolítica intracelular, proteína intracelular, proteína extracelular, CER, OUR y cociente respiratorio (RQ). Además se realizó un estudio de composición elemental del microorganismo al variar la velocidad de dilución.

Con el seguimiento de todos estos parámetros, no se pretendía tan sólo determinar las condiciones óptimas para la producción en cultivo continuo, sino que además se quería llegar a conocer comportamientos intrínsecos del microorganismo, tales como mecanismos de síntesis, excreción de lipasa, variaciones de actividad metabólicas, relaciones entre parámetros macroscópicos internos y externos, variables indirectas sobre ciertos parámetros biológicos,...etc.

En la realización de todos los experimentos se consideraba que el biorreactor se encontraba en estado estacionario sólo cuando se mantenían constantes las variables en estudio dentro del error

experimental durante al menos 3-5 tiempos de residencia. Este criterio se asumió como suficientemente restrictivo para considerar que no se trataba de un estado transitorio.

En principio los períodos transitorios más largos fueron aquellos producidos al pasar de operación en discontinuo a operación en modo continuo, ya que lo normal es que no se llegara al estado estacionario antes de 5-6 tiempos de residencia, teniendo que esperar unos 3-5 tiempos de residencia posteriormente para dar por alcanzado el estado estacionario.

Igualmente se observó que los transitorios eran más largos cuando se pasaba de velocidades de dilución bajas a altas, con la aparición de pequeñas oscilaciones en algunos casos, que cuando lo que se hacía era reducir la velocidad de dilución. Los motivos de estas observaciones se habrían de buscar en conceptos derivados del conocimiento no tan sólo de la hidrodinámica del sistema, sino también de la cinética determinada por el mecanismo de producción de lipasas por *Candida rugosa*.

Como primer experimento para observar la influencia de la velocidad de dilución se llevó a cabo uno en el cual se repetía una dilución ya estudiada  $D=0.06 \text{ h}^{-1}$  y se aumentaba hasta  $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ . La primera fase consta de un cultivo en discontinuo con 2 g/L de ácido oleico y 4 g/L de sulfato amónico. Posteriormente el continuo que se arrancó fue con las mismas concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno. Los resultados experimentales se muestran en la figura 4.29.

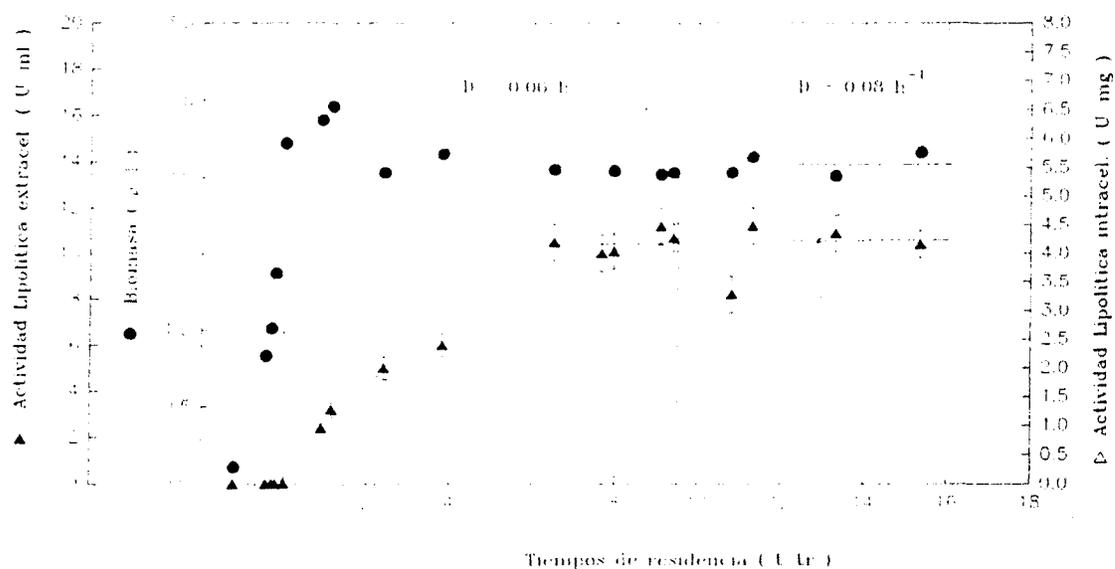
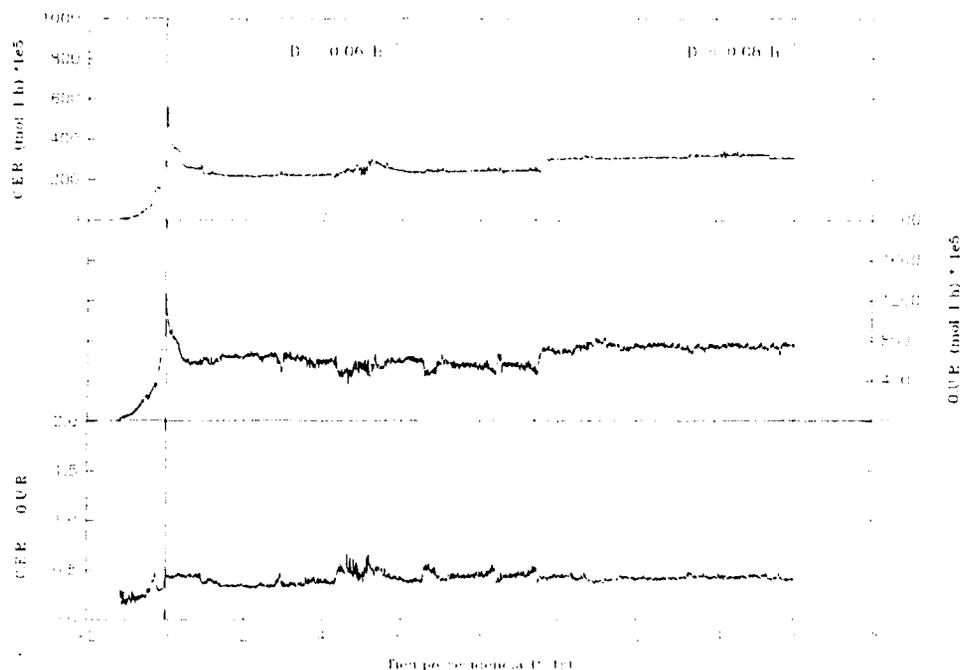


Figura 4.29. Fermentación en continuo con  $D=0.06$  y  $0.08 \text{ h}^{-1}$ .

El arranque se efectuó de manera anteriormente ya descrita, es decir, utilizando la medida del espectrómetro de masas. En este caso se quería observar si la manera de arranque influía de alguna manera en la evolución de la fermentación y el estado estacionario. A diferencia de los experimentos anteriores, éste se arrancó con anterioridad a que la velocidad específica de crecimiento disminuyera hasta valores próximos a la dilución a emplear ( $D=0.06 \text{ h}^{-1}$ ). Según la medida de la CER se puede ver en la figura 4.30 que el arranque se produjo cuando el microorganismo aún se encontraba en fase exponencial tardía. De esta manera, la concentración de lipasas aún no era importante en el momento del arranque y la concentración de ácido oleico comenzaba a agotarse.



**Figura 4.30.** Fermentación en continuo  $D=0.06, 0.08 \text{ h}^{-1}$ , valores de CER,  $\mu$  y  $RQ$ .

Se puede observar que en la biomasa se realizan unas pequeñas oscilaciones debido al transitorio del arranque y que alrededor de unos 3-5 tiempos de residencia se comienza a establecer el estado estacionario. No ocurre lo mismo con la actividad lipásica, ya que presenta un transitorio muy largo, de unos 6-7 tiempos de residencia hasta llegar al estado estacionario. La biomasa y concentración de lipasas obtenida es de 2.05 g/L y 10.5 U/ml respectivamente, lo que está de acuerdo con el experimento realizado para estudiar la influencia de la frecuencia de adición, en el que se llegó a 2.08 g/L y 11.0 U/ml. De esta parte del experimento se puede concluir que el momento de arranque del cultivo en continuo tan sólo tiene un efecto importante en el tiempo de duración del transitorio,

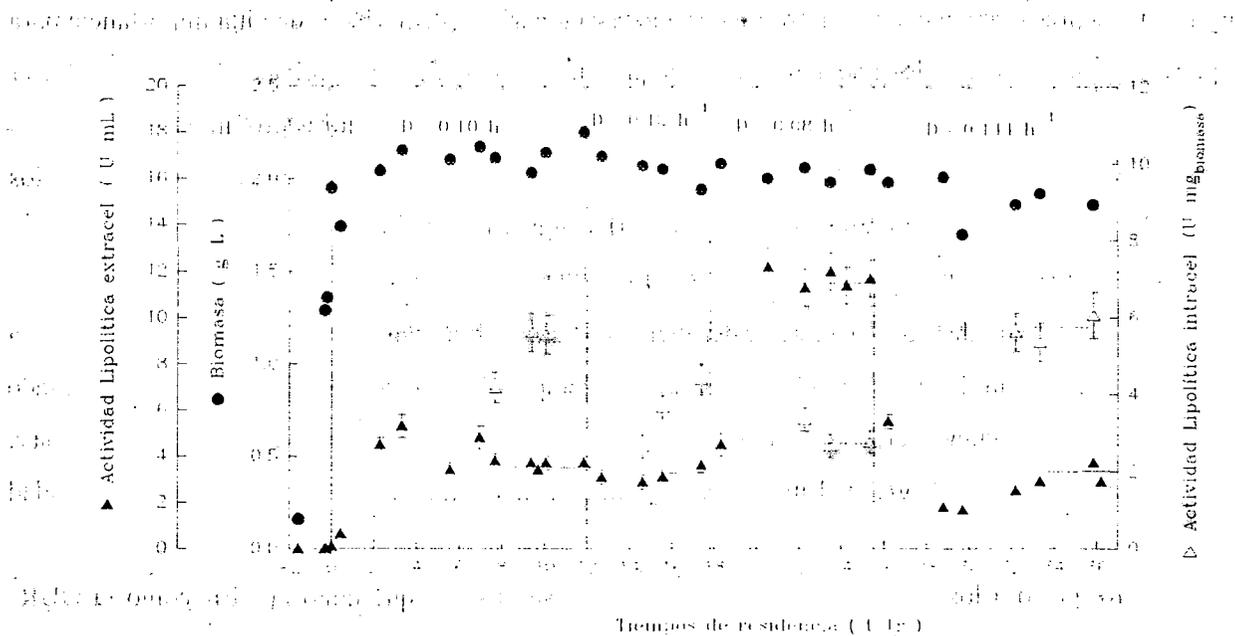
y no afecta prácticamente a los valores del estado estacionario. Este hecho es de vital importancia para poder fijar la estrategia de arranque. Los arranques de fermentación en continuo, se habrán de hacer una vez la velocidad específica de crecimiento haya disminuído hasta valores próximos a la dilución, y a su vez la actividad lipolítica extracelular ya haya alcanzado ciertos niveles, próximos a los obtenidos en cultivo discontinuo.

En la segunda parte de este experimento, en la cual se cambió la velocidad de dilución a  $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ , tras un pequeño transitorio de unos 2 tiempos de residencia se llega a un nuevo estado estacionario. Este nuevo estado estacionario, tiene prácticamente la misma concentración de biomasa y de lipasas, ( $X=2.10 \text{ g/L}$  y  $Lip_{ac} = 10.5 \text{ U/mL}$ ), con lo que se ha mejorado la productividad ( $D \cdot Lip_{ac}$ ).

Respecto a los parámetros CER, OUR y RQ, se observa que tanto la CER como la OUR, aumentan al verse incrementada la velocidad de dilución. Este aumento no es proporcional a la velocidad de dilución, lo que es una señal inequívoca de que tanto la producción de  $\text{CO}_2$  como el consumo de oxígeno no dependen tan sólo de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo. El coeficiente respiratorio (RQ) por el contrario no varía, manteniéndose en niveles de  $RQ=0.43-0.45$ , siendo del orden de los obtenidos en anteriores experimentos.

Posteriormente se prosiguió con el estudio de diferentes velocidades de dilución, viendo el efecto de un aumento de ésta. Se llevó a cabo un experimento a velocidades de dilución mayores, en concreto a  $D = 0.08, 0.10, 0.12, 0.144 \text{ h}_1$ . El arranque se efectuó desde un discontinuo de  $2 \text{ g/L}$  de ácido oleico y  $4 \text{ g/L}$  de sulfato amónico. El primer estado estacionario que se estableció fue el de  $D = 0.10 \text{ h}_1$ . En este arranque se observa un pequeño transitorio, debido a producirse en condiciones más favorables que anteriormente, llegándose al estado estacionario, alrededor de 3-5 tiempos de residencia. Después se fue cambiando la velocidad de dilución obteniéndose diferentes valores de estado estacionario, tal como puede verse en la figura 4.31.

El efecto de un aumento de la velocidad de dilución, en este rango de trabajo, es el de la disminución de la actividad lipolítica extracelular, manteniéndose el valor de la biomasa hasta los valores de la velocidad de dilución próximos al lavado del biorreactor. Por otra parte a la vez que la actividad extracelular disminuye la actividad intracelular va aumentando, lo que denota claramente un fenómeno de acumulación. Esto sería debido a que la excreción del enzima, en esta zona de velocidad de dilución, es la etapa limitante en la producción y no la de síntesis del enzima. De este modo, al ir aumentando la velocidad de dilución (disminuir el tiempo de residencia), y probablemente la velocidad de excreción estar saturada, el microorganismo no es capaz de excretar la proteína con



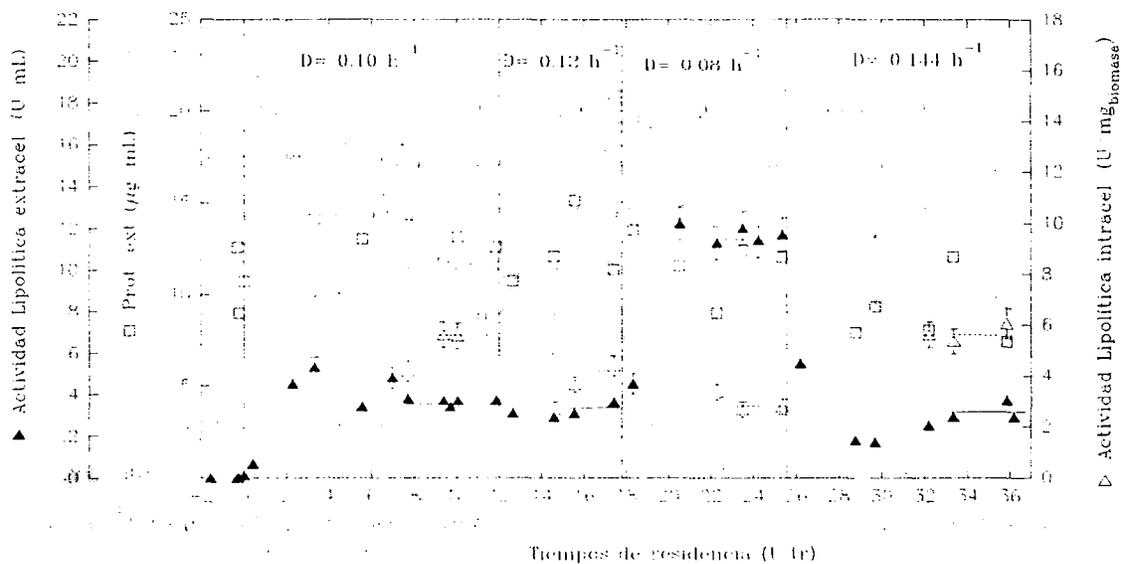
**Figura 4.31.** Influencia de la velocidad de dilución sobre la biomasa, lipasa extracelular e intracelular.

la suficiente rapidez, lo que provoca una acumulación en su interior.

No obstante no hay que olvidar, que previamente a la fase de excreción puede existir otro tipo de fenómeno que no se haya tenido en cuenta, tal como el hecho de que la lipasa excretada puede ser en algunos casos más activa que en otros dependiendo de la dilución. Para intentar aclarar ésto, y previamente a una caracterización y estudio de actividad específica de esta lipasa, se realizó el estudio de la proteína total extracelular y su variación con la actividad lipásica extracelular obtenida en el cultivo continuo. Tal como se puede ver en la figura 4.32, los niveles de proteína total extracelular, son del mismo orden, aun variando la actividad extracelular. Si suponemos que la lipasa no representa un porcentaje importante en la proteína total extracelular, esta observación estaría de acuerdo con el hecho de que la excreción sea la etapa limitante.

Por último se llevó cabo un experimento en el cual se estudió el comportamiento del sistema a velocidades de diluciones bajas y en puntos próximos a la velocidad máxima de crecimiento para forzar el lavado del biorreactor.

En la figura 4.33 se muestran los resultados obtenidos para las velocidades de dilución  $D =$



**Figura 4.32.** Influencia de la velocidad de dilución sobre la proteína total extracelular, lipasa extracelular e intracelular.

0.03, 0.0455 h<sup>-1</sup>. A velocidades lentas se observa un mantenimiento de los niveles de biomasa. La lipasa extracelular aumenta al disminuir la velocidad de dilución, lo que está de acuerdo con los experimentos anteriores. Por otra parte, la lipasa intracelular disminuye al disminuir la velocidad de dilución, lo que estaría de acuerdo con que la etapa de síntesis fuera en este caso la etapa limitante y no hubieran problemas de excreción.

Cuando se trabaja a velocidades de dilución altas, la biomasa comienza a disminuir ya que empiezan a producirse el fenómeno de lavado. Igualmente la lipasa intracelular y extracelular van disminuyendo a medida que se lava el reactor tal como se observa en la figura 4.35.

Como resumen de todos los experimentos realizados en cultivo continuo para ver el efecto de la velocidad de dilución, en las figuras 4.35 y 4.36 se presenta la variación de la biomasa, actividad lipolítica extracelular e intracelular, así como las productividades de cada una de ella.

La biomasa tiene una dependencia respecto a la velocidad de dilución típica, es decir para velocidades de dilución bajas y medias se mantiene para empezar a disminuir a diluciones próximas a la velocidad específica máxima de crecimiento, y finalmente descender a valores prácticamente nulos.

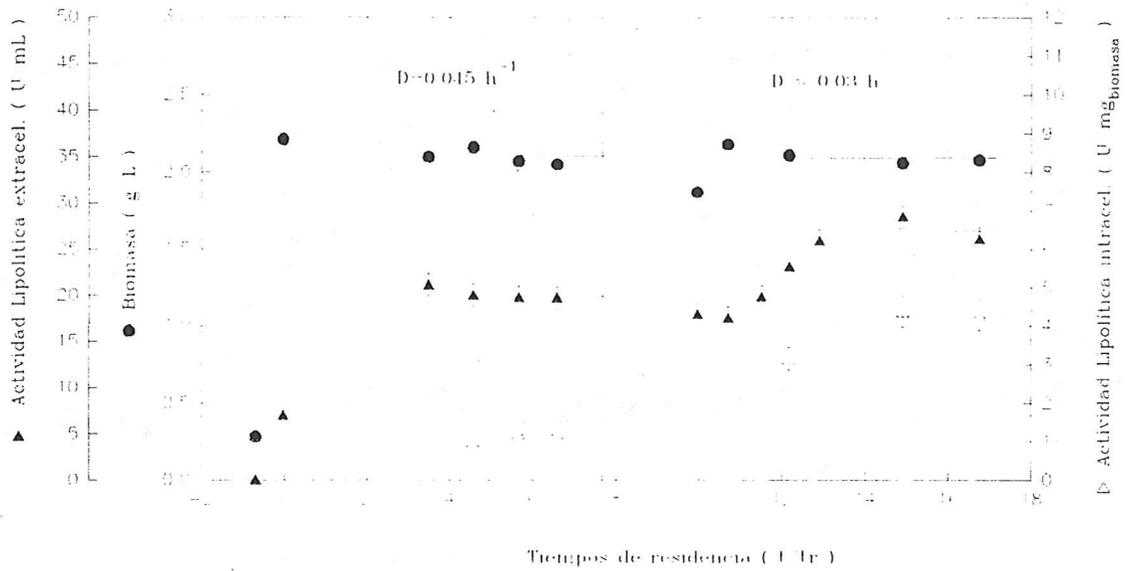


Figura 4.33. Fermentación en continuo a velocidad de dilución  $D=0.03, 0.0455 h^{-1}$

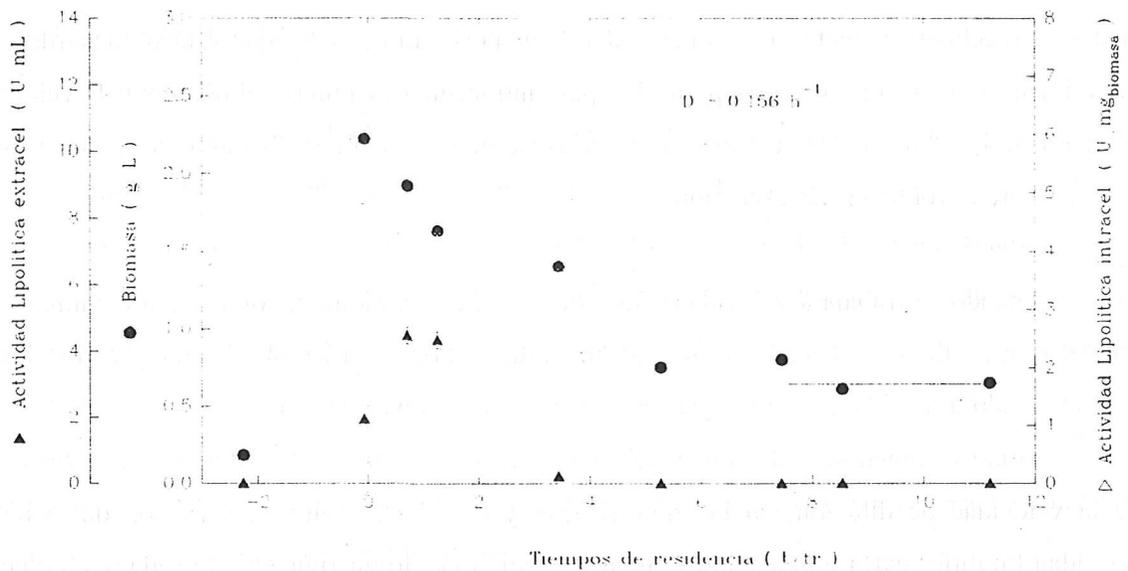


Figura 4.34. Fermentación en continuo a velocidades de dilución  $D=0.156 h^{-1}$ .

La lipasa extracelular tiene sus valores máximos a diluciones bajas para ir disminuyendo progresivamente hasta llegar a valores indetectables en la zona de lavado.

La lipasa intracelular por su parte sigue un comportamiento contrario a la extracelular, aumentando conforme disminuye el tiempo de residencia para acabar siendo indetectable en la zona de lavado. El comportamiento conjunto en la evolución de la lipasa extracelular e intracelular apuntaría hacia un posible fenómeno de limitación en la excreción, acentuado cuando la velocidad de dilución es grande y por tanto el microorganismo no es capaz de excretar el enzima con la suficiente rapidez para no producirse la acumulación en su interior.

Respecto a la productividad total y específica de la lipasa extracelular, vemos que se mantiene constante durante la primera zona de velocidades de dilución para pasar por un pequeño máximo sobre  $D=0.08 \text{ h}^{-1}$  de  $0.88 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{h})$  y continuar disminuyendo hasta valores prácticamente nulos. La productividad total de la lipasa intracelular seguiría un comportamiento inverso, llegando a sus valores máximos en la zona próxima al lavado.

Como información complementaria es importante prestar atención a los parámetros respiratorios que se muestran en las figuras 4.37 y 4.38.

En la figura 4.37 se presentan los resultados obtenidos para la CER y OUR en función de la velocidad de dilución. En general la tendencia es creciente para empezar a disminuir en puntos próximos al lavado.

En la figura 4.38 se presenta la evolución del cociente respiratorio en función de la velocidad de dilución. El RQ siempre se encuentra acotado entre valores de  $RQ = 0.41-0.45$  lo que muestra que prácticamente es constante. A pesar de ello se observa una pequeña tendencia de disminución al aumentar la velocidad de dilución, al operar a tiempos de residencia menores. Ello es debido a que la velocidad de consumo de oxígeno aumenta en proporcionalmente más que la de producción de  $\text{CO}_2$ .

Un hecho importante es que tanto la CER como la OUR no tienen ordenada en el origen igual a 0 después de extrapolar sus valores. En este caso, despreciando el posible error experimental y de esta extrapolación, se puede concluir que tanto la producción de  $\text{CO}_2$  como el consumo de oxígeno no son tan sólo función de la velocidad específica de crecimiento, sino que además depende de algún otro factor. Dado que las curvas prácticamente son una recta hasta que empieza la zona de lavado, sería aceptable pensar en que además dependieran de la biomasa. Por otra parte este nuevo término tendría un significado de mantenimiento celular, producción o consumo simplemente por requerimientos energéticos y no de crecimiento.

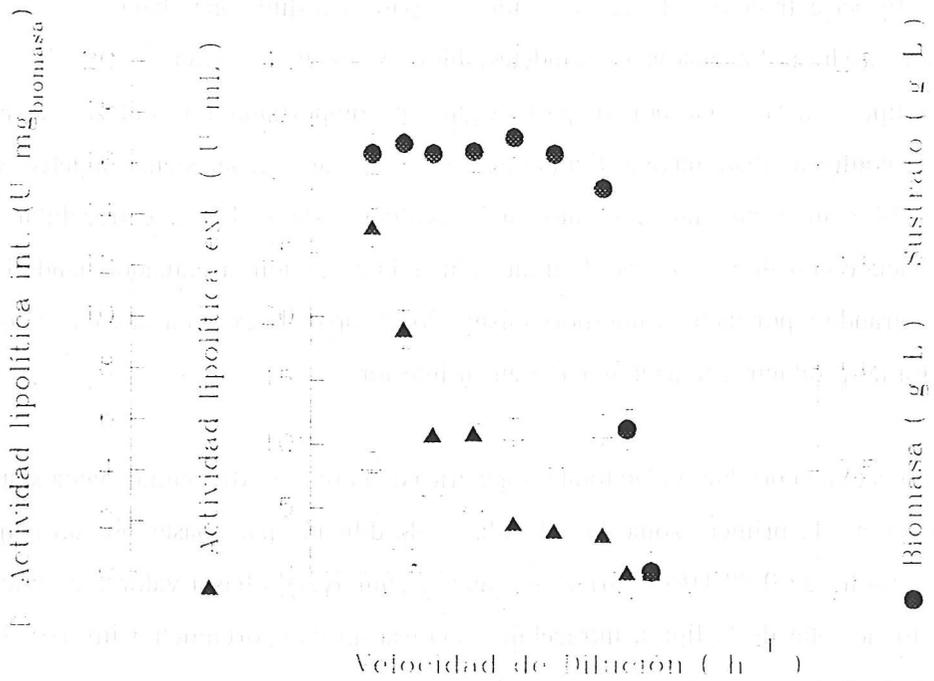


Figura 4.35. Efecto de la velocidad de dilución en una fermentación en continuo.

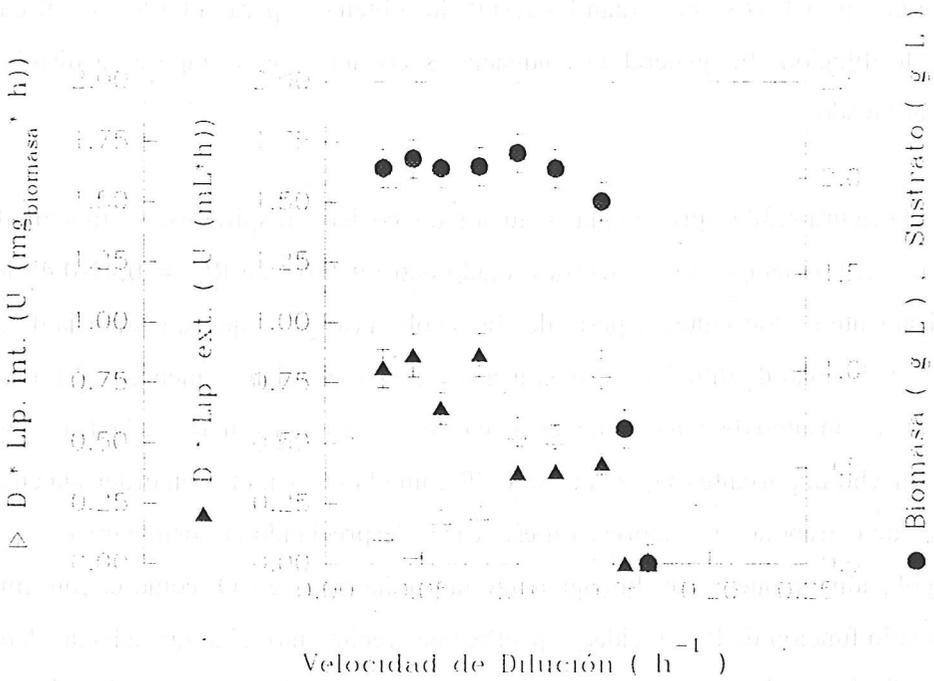


Figura 4.36. Efecto de la dilución sobre las productividades en una fermentación en continuo.

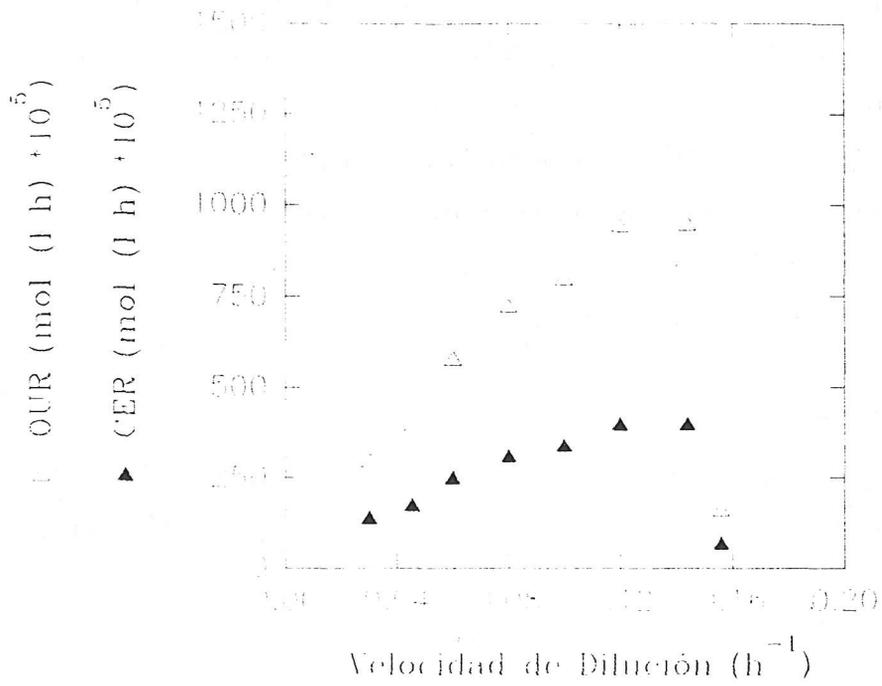


Figura 4.37. CER y OUR en función de la velocidad de dilución.

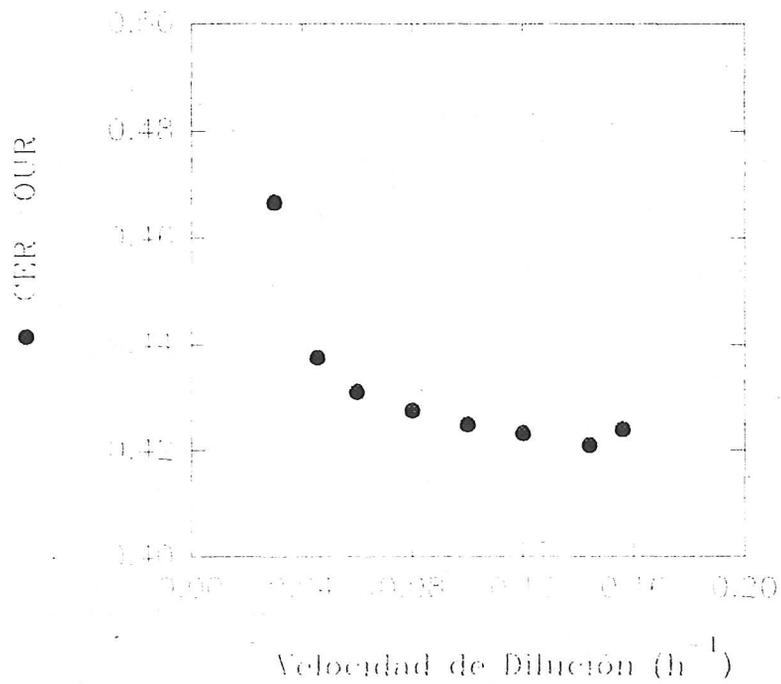


Figura 4.38. Cociente respiratorio en función de la velocidad de dilución.

Por ello, si realizamos una representación de la CER y la OUR divididas por la biomasa respecto a la velocidad de dilución, se podrá realizar una regresión lineal para obtener los coeficientes A,B y A',B' correspondientes a las expresiones del tipo:

$CER = (A*\mu+B)*X$  ,  $OUR = (A'*\mu+B')*X$ . Esta representación se muestra en la figura 4.38, demostrando un buen ajuste entre la relación propuesta y los datos experimentales.

$$CER = (A * \mu + B) * X$$

$$A = 1309 ( )$$

$$B = 32.8 ( )$$

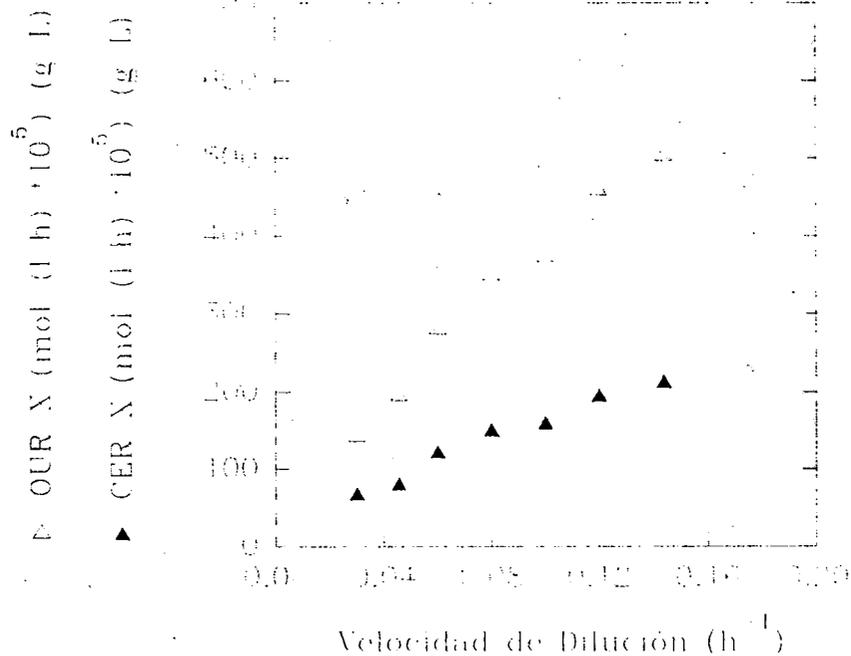
$$R =$$

$$OUR = (A' * \mu + B') * X$$

$$A' = 3173 ( )$$

$$B' = 68.6 ( )$$

$$R =$$



**Figura 4.39.** Representación gráfica para obtener los coeficientes correspondientes para la CER y OUR en función de  $\mu$  y X.

### **4.3. Medida y estimación.**

#### **4.3.1. Instrumentación.**

La obtención de productos de alto valor añadido mediante procesos biotecnológicos es una práctica bien establecida en áreas como la producción de antibióticos, enzimas y biotransformaciones. La mayoría de los procedimientos utilizados son de origen empírico y frecuentemente, su control se realiza utilizando un número limitado de aparatos y técnicas.

El incremento de la competitividad, la necesidad de reproducibilidad a nivel de calidad de producto y el uso de sistemas biológicos más complejos (multifásicos, organismos genéticamente inestables...) están impulsando la necesidad de mejorar las estrategias actuales de producción.

En general, se puede decir que existen tres formas diferenciadas de mejorar las prácticas operativas, las cuales se están desarrollando simultáneamente.

La primera, es el aumento del número disponible de elementos sensores. En la bibliografía se pueden encontrar numerosas publicaciones sobre aplicaciones en reactores biológicos (Schügerl y col. 1990), de sistemas de HPLC automatizados, análisis de inyección en flujo (FIA), espectrometría de masas y biosensores.

En segundo lugar, cuando no hay posibilidad de medidas directas, la estrategia seleccionada es la obtención de medidas indirectas o la estimación de variables o parámetros, lo cual constituye los comúnmente llamados sensores lógicos. Esta metodología utiliza técnicas matemáticas, como los métodos del Filtro de Kalman Extendido (EKF) (Stephanopoulos y col. 1984, Valero y col. 1990), método de predicción de error recursivo (RPE) (Ljung y col. 1983, Flaus y col. 1990) o redes neuronales (Karim y col. 1992, Thibault y col. 1992), los cuales están basados en la modelización matemática. A menudo las técnicas tanto de "software" como de "hardware" se encuentran integradas en el mismo laboratorio para obtener resultados más fructíferos.

De este modo, el cumplimiento de la espectrometría de masas (MS) a procesos biológicos puede ser una herramienta muy potente para realizar balances de materia en la fase gas, y para monitorizar concentraciones de compuestos volátiles y gases disueltos (Heinzle 1987). Los espectrómetros de masas ofrecen bastantes ventajas respecto los analizadores de gases de tipo infrarrojo y paramagnético tales como: menor deriva de señal/calibración, tiempos de respuesta más pequeños y menor dificultad de mantenimiento. Además, la rapidez y tiempos de respuesta necesarios

hacen del espectrómetro un equipo ideal para esquemas multitarea. En contra de todas estas ventajas, las aplicaciones en procesos fermentativos de los espectrómetros de masas cuadrupolares han sido restringidas debido al alto coste y a las dificultades de conexión e interacción con el proceso (Copella y col. 1987).

Tercero, en un plano diferente pero relacionado con los anteriores, se están aplicando técnicas de control avanzado más potentes (Beck y col. 1989) para acoplarse a las características específicas de los procesos biológicos, como son la gran no linealidad, parámetros variables con el tiempo, etc... El control adaptativo, modelos de control interno (Henson y col. 1991) y otras técnicas avanzadas están siendo aplicadas a transformaciones bioquímicas en modo discontinuo, semicontinuo o continuo.

Todas estas técnicas comparten con el diseño de secuencias óptimas de procesos de separación la utilización de ordenadores potentes y técnicas computacionales. El rápido incremento de la capacidades de los ordenadores, cada vez a precios más reducidos hacen posible la aplicación industrial, en tiempo real, de técnicas de gestión de la información, que anteriormente sólo eran disponibles sobre los computadores de alto nivel y no trabajando en tiempo real, o a un coste no asequible. Es importante remarcar las herramientas de Inteligencia Artificial (AI) (Konstantinov y col. 1992), en áreas como los sistemas expertos, identificación de pautas, detección de fallos y "software" de tipo supervisor.

A la hora de desarrollar un sistema integrado capaz de resolver los problemas específicos de la producción de lipasas por *Candida rugosa* se plantearon los siguientes objetivos:

- Implementar un entorno o conjunto experimental donde los diferentes equipos están conectados a un ordenador central, que sustituye o reemplaza los controladores locales.
  
- Desarrollar un modelo matemático capaz de describir de forma adecuada el comportamiento del proceso, prestando especial atención a las características de tipo dinámico.
  
- Desarrollar estrategias de control y operación para optimizar la producción de lipasas, teniendo en cuenta los últimos pasos relacionados con los procesos de separación y purificación. Esto se llevaría a cabo mediante un software residente en una estación de trabajo, situada en una posición jerárquica superior.
  
- Desarrollar una aplicación de tipo supervisor conectada en tiempo real con el fermentador,

la cual se encuentre en la posición jerárquica más alta desde el punto de vista de decisión. Las funciones de este sistema supervisor, no posibles mediante un control convencional, son: validación de datos, identificación del estado del cultivo celular, detección y diagnóstico de fallos de instrumentación, supervisión del control convencional, comunicación con el operario/usuario y finalmente la supervisión general de la planta y planificación.

El logro de estos objetivos puede permitir: mejorar la estabilidad operacional utilizando técnicas de control clásicas y avanzadas, ampliar el conocimiento del proceso, deberían maximizar la productividad específica y aumentar la producción de lipasas.

El sistema de fermentación y la naturaleza del medio de cultivo hacen realmente difícil la medida en línea y en tiempo real. El sistema de fermentación consta de cuatro fases diferentes: dos líquidas (orgánica y acuosa), una sólida (microorganismo) y otra gas, entre las cuales hay complejas interacciones. Además, los instrumentos o sensores adecuados para utilizarse deben ser esterilizables o instalados de tal manera que eviten una posible contaminación del cultivo. Los sistemas disponibles comercialmente y de los que dispone inicialmente el fermentador son los sensores de temperatura, pH, oxígeno disuelto (D.O.) y velocidad de agitación, equipados con sus correspondientes controladores.

La presencia de compuestos oleosos (fase orgánica) dispersos en el medio de cultivo hace que la medida de densidad óptica (O.D.) sea inaplicable para el seguimiento del crecimiento celular. De este modo, el sistema presenta muchas de las principales dificultades inherentes a los procesos de producción biológicos complejos.

A parte de la instrumentación disponible en el fermentador Braun Bioestat E utilizado, se implementaron convertidores analógico/digital y digital/analógico para permitir la monitorización de los principales parámetros de fermentación y poder cambiar los puntos de consigna desde un ordenador externo. Este esquema estándar en procesos de fermentación se ha complementado con otros equipos externos, conforme ha ido surgiendo la necesidad, para obtener la máxima información sobre la producción de lipasas por *Candida rugosa*.

De este modo, tal como se ha descrito en antecedentes experimentales, cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, se desarrolló un analizador automático FIA de glucosa (Valero y col.1990). Un Filtro de Kalman Extendido (EKF), fue seleccionado para identificar la evolución de la biomasa, utilizando tan sólo la medida de la concentración de glucosa (Valero y col. 1990). Al cambiar el substrato por aceite de oliva o ácido oleico, la concentración de lipasas se consideró la variable de mayor importancia para monitorizarla. Con este propósito, se desarrolló e implementó un analizador de actividad lipásica. Este método es capaz de realizar el análisis con mayor frecuencia y

reproducibilidad que el método titrimétrico manual (Valero y col. 1991). Las muestras libres de biomasa se obtienen a través de un sistema de toma de muestras, ya descrito en un anterior capítulo, dando resultados satisfactorios respecto a separación de biomasa y mantenimiento de las condiciones de esterilidad.

La dificultad en la medida en línea de la concentración de substrato orgánico y la biomasa en la fermentación causa una falta de información de los parámetros clave necesarios para futuras aplicaciones de control. Para evitar esto, se ha acoplado al sistema experimental un espectrómetro de masas cuadrupolar comercial (Spectramass PC 2000) (Montesinos y col. 1993).

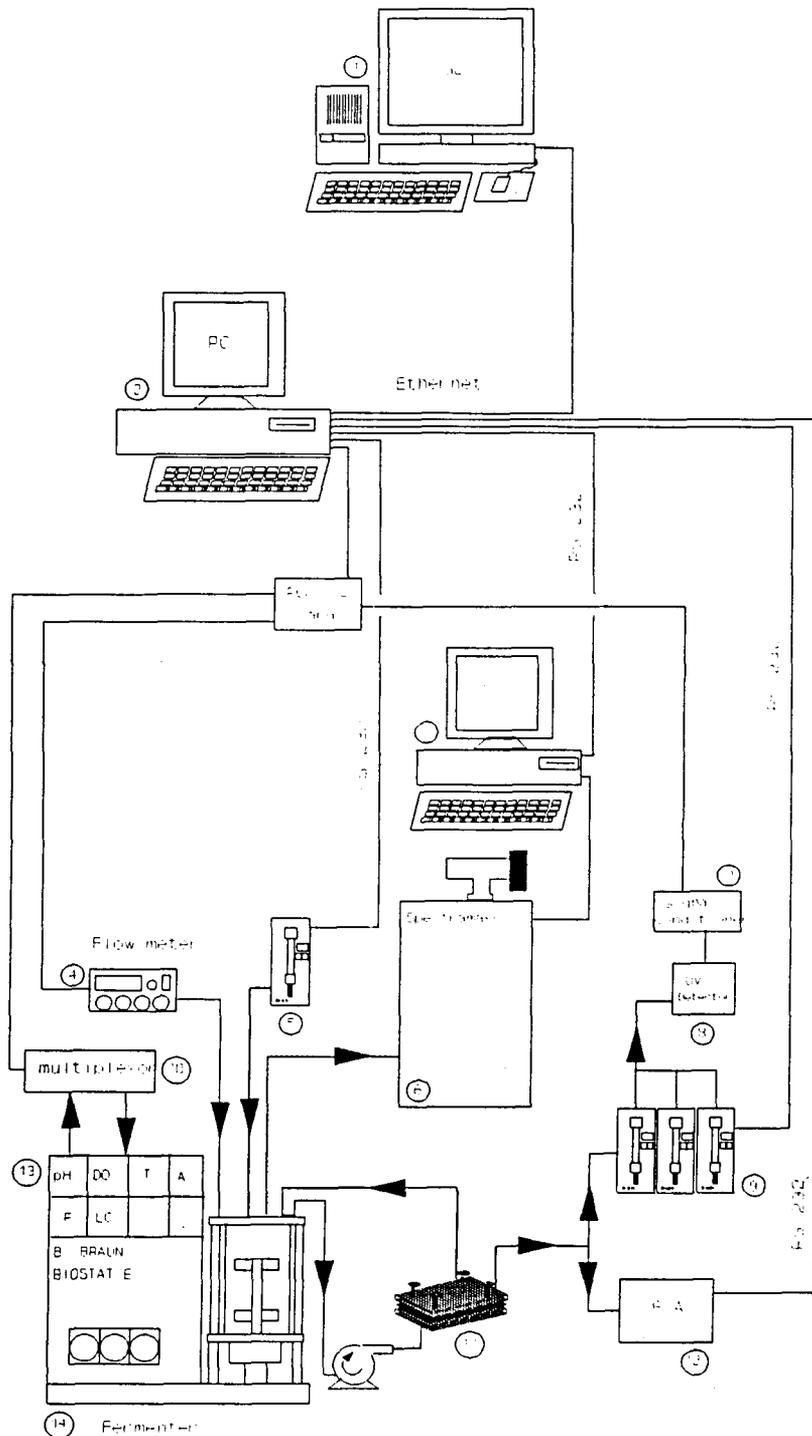
El equipo de control del espectrómetro de masas se encuentra situado en la posición jerárquica más baja. El próximo nivel está compuesto por los controladores locales, actuadores y gestores de los equipos periféricos previos al ordenador central. El sistema supervisor tendría su punto de operación en la posición jerárquica superior. (figura 4.40).

#### *Sistema supervisor*

El sistema supervisor se ha desarrollado en un entorno preparado para construir sistemas expertos en tiempo real (G2 de Gensym Co.). Este sistema trabaja en una estación de trabajo (SUN SPARCstation 1) y está compuesto por una base de conocimiento y un software de comunicaciones, tal como se muestra en la figura 4.41.

La base de conocimiento está constituida por diferentes espacios de trabajo, donde el conocimiento se almacena o mantiene según una estructuración adecuada. De este modo, existen espacios de trabajo para las definiciones de objetos y sus jerarquías, el esquema de proceso, las pantallas gráficas para monitorizar los valores de las variables o parámetros clave, y reglas para diferentes propósitos: estrategias de control y operación, detección de fallos, acciones de control por el operador, etc... Esta base de conocimiento estructurada permite una incorporación fácil de nuevos elementos, conforme vayan siendo necesarios.

El sistema es capaz de emplear diferentes estrategias de control (que van desde esquemas de control clásicos hasta avanzados) en función de la situación del proceso y las estrategias de operación que se quieran aplicar en cada caso particular. También, la conexión del sistema experto a



**I. 1. WORKSTATION**

Supervisory control  
Expert system/G2

**II. 2. MAIN PC**

Gas analysis  
Pump Feed  
Graphics  
Keyword  
Carbon source addition  
Lipase analysis  
Glucose FIA analyzer

**III. CONTROLLERS/  
ACTUATORS /  
MANAGEMENT**

3. PC/Mass spectrometer  
4. Mass Flow meter/controller  
5. Carbon source addition

**IV. SENSORS DEVICES/  
ON-LINE MONITORING/  
PERIPHERAL DEVICES**

6. Mass spectrometer/  
gas analysis  
7. Signal conditioner  
8. UV detector  
9. Reagent addition,  
sample addition/  
dilution; system cleaning.  
10. Multiplexor D/A  
A/D conversor  
11. Microfiltration unit.  
12. Glucose FIA analyzer  
13. pH, DO,T agitation,  
etc sensors.

**V. 14. FERMENTER**

Figura 4.40. Esquema del sistema de fermentación.

programas externos (lenguajes de simulación, aplicaciones auxiliares, equipos de análisis,...) facilita el uso de tales estrategias.

Se han adicionado subrutinas de comunicación necesarias para la comunicación de G2 con otras aplicaciones, en nuestro caso para comunicar el sistema supervisor con el software residente en ordenador central. Este proceso de comunicación incluye la recepción de datos recolectados por el

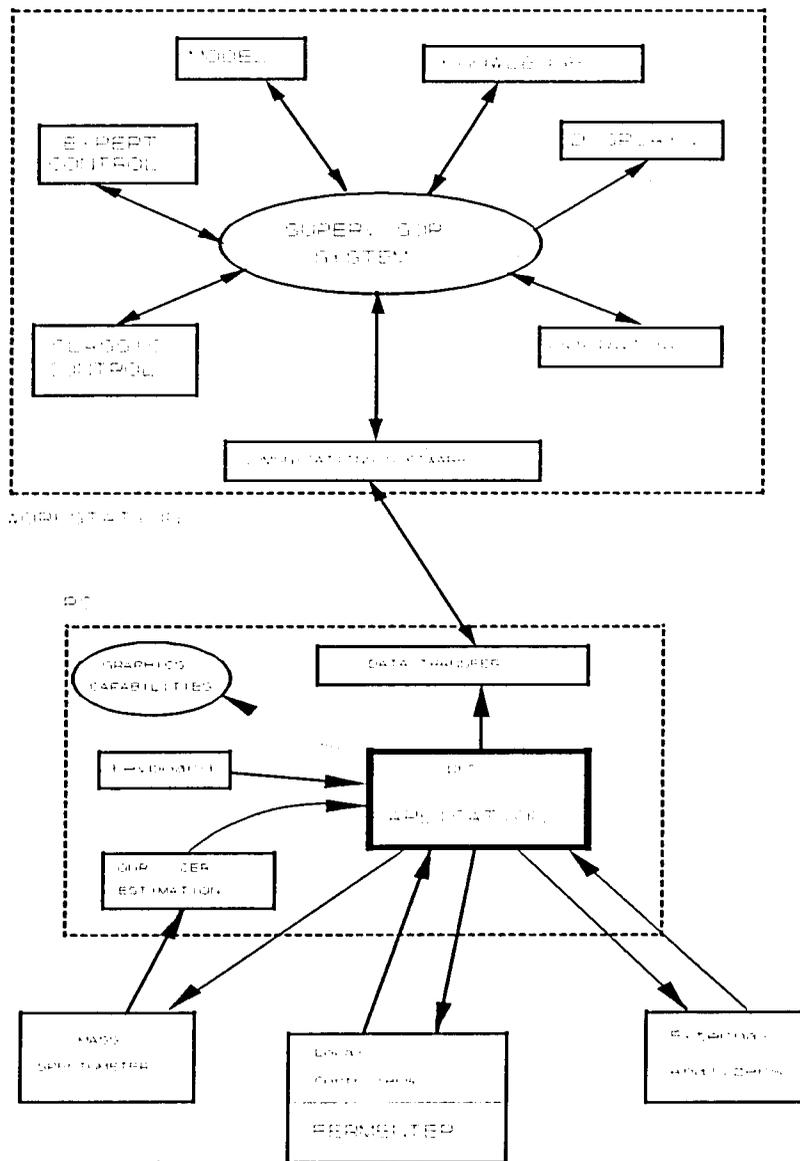


Figura 4.41. Esquema de flujo de información del sistema experto.

PC central, transfiriendo los puntos de consigna de los controladores en ambos sentidos (puntos de consigna seleccionados por o del sistema supervisor para el PC y los seleccionados a través del teclado del PC hacia el sistema supervisor) y otras transferencias de órdenes o mandatos.

El software residente en el PC central, escrito en C++, está comunicado con el sistema supervisor mediante un enlace de tipo Ethernet link. Este PC también está conectado a todos los aparatos del sistema de fermentación lo que permite una fácil interacción entre ellos, monitorización en tiempo real (pantallas gráficas), modificación de parámetros operacionales, adquisición de datos y control del espectrómetro de masas, recalibración y manejo del analizador de lipasas, y transferencia de ficheros de datos.

Este programa puede cambiar los puntos de consigna de los controladores y enviar diferentes mandatos o instrucciones a los aparatos (espectrómetro de masas, analizador automático de lipasas, analizador de glucosa FIA, medidores y controladores de flujo de aire, bombas dosificadoras,...), basadas en ordenes del operador a través del teclado u órdenes provenientes del sistema supervisor, sean del usuario o del propio sistema supervisor, monitorizando variables como la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) o la velocidad de producción de dióxido de carbono (CER) a partir de los análisis de gases de salida, y la recalibración automática del espectrómetro de masas.

De este manera con la construcción de este sistema inteligente se ha puesto ha punto la metodología y herramientas necesarias para poder realizar el procesado de datos de fermentación en tiempo real, actuar en todos los elementos del proceso fermentativo, estimar parámetros para variables no medibles directamente, evitando la falta de información disponible de parámetros clave para objetivos de control, la utilización de conocimiento heurístico del proceso, y aplicar estrategias de control avanzadas.

#### 4.3.2. Utilización de la espectrometría de masas.

Una de las aplicaciones más importantes de la espectrometría de masas en los procesos fermentativos es el análisis de los gases de salida del fermentador. La medida de la composición de los gases de salida acoplada a la potencia de los ordenadores hace posible generar datos en línea de gran importancia. Entre ellos se incluyen la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), la velocidad de producción de dióxido de carbono (CER) y el cociente respiratorio (RQ), obtenidos con un alto grado de exactitud (Heinzle y col. 1985).

Esta información puede ser utilizada para estimar la biomasa y la velocidad específica de crecimiento mediante diferentes métodos, entre los cuales se encuentran, la integración y derivación directa o el método Recursivo de Error de Predicción (RPE) (Ljung y col. 1983) como alternativa al Filtro de Kalman Extendido (Stephanopoulos y col. 1984). Cuando, como en nuestro caso, tan sólo son posibles medidas indirectas en línea de la biomasa, es interesante considerar la aplicación del método RPE, el cual podrá solventar problemas de complejidad del modelo, manteniendo unas mejores propiedades de convergencia.

También la evolución del sustrato, la biomasa y algunos productos, puede ser obtenida con las medidas de la CER y OUR, aplicando técnicas elementales de balances de materia (Chattaway y col. 1992), siempre y cuando la composición elemental del microorganismo se mantenga constante a lo largo de la fermentación, y nos encontremos ante un sólo conjunto de reacciones en el microorganismo.

Los objetivos de esta parte del trabajo realizado han sido: el desarrollar un software específico capaz de realizar la comunicación con el software del espectrómetro de masas (Spectramass PC 2000), el procesamiento de datos para obtener la CER, OUR y RQ, la recalibración automática del MS, la monitorización en tiempo real, disponer de posibilidades gráficas y la estimación en línea de la biomasa viable y de la velocidad específica de crecimiento.

#### *Análisis de gases. Determinación de CER, OUR y RQ*

El espectrómetro de masas utilizado ha sido de tipo cuadrupolar. El espectrómetro permite el uso de dos tipos diferentes de detector. Las necesidades de sensibilidad del detector para la aplicación deseada no requieren la utilización de un detector del tipo multiplicador de electrones (EM). De este modo el detector utilizado ha sido el de tipo Faraday, seleccionado por su simplicidad, estabilidad y reproducibilidad teóricas.

En un espectrómetro de masas cuadrupolar se tienen inherentemente contribuciones hacia pesos moleculares más bajos que el pico molecular correspondiente al compuesto a analizar. Estos

fenómenos son característicos de las condiciones de operación del espectrómetro de masas (ionización, enfoque, y resolución). De cara a las aplicaciones analíticas, es útil la calibración ocasional y la medida de señal de fondo, debido principalmente a posibles cambios en la resistencia del capilar al flujo de gas en su interior.

Para el análisis de todos los compuestos de interés, los factores de respuesta se han generado relativos al nitrógeno (Coppella y col. 1987), el cual ha sido usado también como componente clave para el cálculo de la OUR, CER y RQ. El cálculo de los factores de respuesta se ha hecho utilizando gases de calibración adecuados, siendo siempre mezclas próximas a las realmente analizadas, con una precisión mínima garantizada de un 2 % relativo. Así, las composiciones en fracción molar de la fase vapor se han obtenido según la siguiente expresión  $X_i = f_i * r_i / \text{SUM}(f_i * r_i)$ , siendo  $f_i$  y  $r_i$  los factores de respuesta y la respuesta del componente "i" respectivamente.

Debido a la severa deriva de calibración observada, se realizan calibraciones periódicamente para evitar suficientemente este problema. Los errores sistemáticos debidos a un proceso de calibración de poca exactitud, ausencia de suficiente precisión de las mezclas de gases o pequeñas derivas en las señales, son en general más graves que los errores de tipo estadístico (Heinzle 1987). Especialmente con instrumentos basados en pequeños cuadrupolos, una calibración periódica es suficiente para solucionar la mayoría de estos problemas.

El cálculo de la OUR es función de la diferencia de concentración de oxígeno en la fase gas entre el aire de entrada y salida del fermentador. Hay veces en que la diferencia es menor que el 1% absoluto, y entonces un pequeño error en la calibración para el oxígeno puede causar un error considerable en la OUR. Esto habrá de tenerse en cuenta a la hora de decidir la frecuencia del proceso de calibración/recalibración.

Para el análisis de gases en una fermentación, los siguientes componentes son los más importantes:  $N_2$  (M=28),  $O_2$  (M=32), Ar (M=40),  $CO_2$  (M=44). El  $H_2O$  (M=18) se mide también para evitar niveles altos a la entrada del espectrómetro, pero el balance de gases se realiza en base seca. Especialmente cuando se tengan composiciones bajas, es necesario restar la contribución debida a la señal de fondo. El balance de gases se ha realizado midiendo el caudal de gas de entrada con medidores de flujo másicos de tipo térmico (Brooks Instruments). Las composiciones de todos los componentes para los gases de salida son medidos por el espectrómetro. Debido a que los flujos másicos de los gases inertes ( $N_2$ , Ar) permanecen constantes para las condiciones de estado estacionario, es posible calcular el caudal másico de salida:  $F_{sal} = F_{ent} * X_{ent,Nit} / X_{sal,Nit}$ . De esta

manera tan sólo es necesario medir el caudal másico a la entrada del reactor.

Aplicando la expresión anterior, la OUR, CER y RQ pueden ser calculadas según las expresiones:

$$\text{OUR} = (-) F_{\text{ent}} * ( X_{\text{ent,O}_2} - X_{\text{sal,O}_2} * X_{\text{ent,Nit}} / X_{\text{sal,Nit}} )$$

$$\text{CER} = - F_{\text{ent}} * ( X_{\text{ent,CO}_2} - X_{\text{sal,CO}_2} * X_{\text{ent,Nit}} / X_{\text{sal,Nit}} )$$

$$\text{RQ} = \text{CER} / \text{OUR}$$

Es esencial tener en cuenta que, para el cálculo más exacto de estas variables, estas expresiones son sólo válidas si las condiciones de estado quasi-estacionario se mantienen, la acumulación en la fase líquida y gas es despreciable y las variaciones en el pH no son significativas (Royce 1992, Royce y col. 1992).

#### *Sistema de análisis.*

En la figura 4.42 se muestra esquemáticamente el sistema de análisis, adquisición de datos, y sistema de control. Un ordenador tipo PC controla y monitoriza el sistema, efectuando almacenamiento de datos adecuado y rápido. La entrada de aire controlada se hace mediante dos medidores/controladores de flujo másico de tipo térmico, que permiten trabajar en diferentes intervalos de trabajo (0-1 L/min y 0-20 L/min medidos en condiciones normales). Se utiliza el ordenador principal puede cambiar de forma automática cual de estos dos caudalímetros. El aire de entrada a los medidores de flujo se filtra a través de un prefiltro y de un filtro desecador. Posteriormente, antes de entrar al fermentador, se utiliza un filtro estéril de tipo piedra porosa.

Es importante que la espuma y el agua condensada no penetren en el interior del espectrómetro de masas. En el sistema de análisis puesto a punto, ésto se consigue de la siguiente manera:

- La línea de salida de gases del fermentador está enfriada mediante agua de refrigeración para prevenir una posterior condensación en el interior del aparato.
- Si la temperatura en el reactor alcanza los 60°-70°C, la válvula de escape se cierra automáticamente por una orden de tipo eléctrica desde el fermentador. Esta válvula está situada antes de la línea de salida de gases anterior a la válvula de control de presión.
- Si la presión del reactor está por encima o debajo de unos ciertos valores críticos, el ordenador ordenará el cierre de la válvula de control de presión.

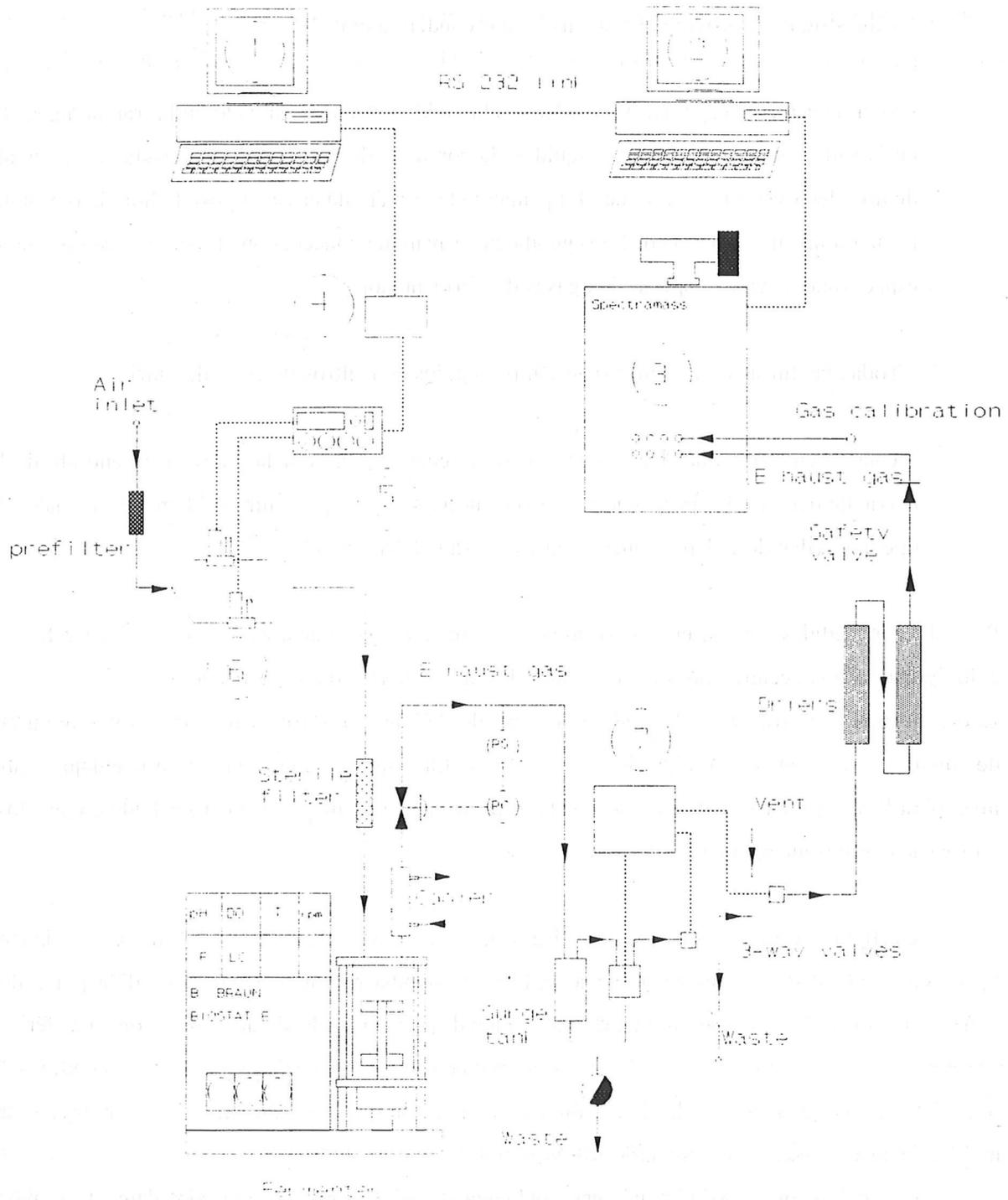


Figure 4.42. Fermentation system. (1) Control and monitoring computer. (2) PC Mass spectrometer. (3) Mass spectrometer. (4) PCL-812 card. (5) Flow meter displays. (6) Thermal mass flow meter and controller. (7) Foam controller.

- En la línea de gases de salida o de muestreo se ha instalado un depósito de recogida de posibles líquidos provenientes de arrastre o condensación.
- Si el detector de espuma, basado en conductividad eléctrica, situado en la trampa instalada en la salida, detecta espumas o líquidos, la corriente de gas es redireccionada con la ayuda de dos electroválvulas de 3 vías. La primera electroválvula envía el posible líquido o espuma hacia un tanque de desecho. La segunda electroválvula conecta con el exterior, con lo que el espectrómetro ya no aspirará los gases del fermentador.
- Todas las líneas e instrumentos están protegidos con filtros de fibra de vidrio.
- Una válvula de control de presión o de retención está situada antes de la entrada de la corriente del gas al espectrómetro. Esto es necesario para prevenir problemas adicionales de operación debido a depresiones en la cabecera del fermentador.

Para obtener medidas fiables, el agua residual se elimina del gas a analizar mediante sílica-gel. Esto evita igualmente concentraciones de agua elevadas en el interior del espectrómetro.

El ordenador PC central controla y adquiere datos del PC del espectrómetro de masas via un puerto de comunicaciones en serie utilizando código ASCII. La comunicación requiere un lenguaje de alto nivel para llevarse a cabo. Los parámetros del espectrómetro de masas pueden ser leídos, enviados, y ordenada su búsqueda por el ordenador central.

La figura 4.43 muestra esquemáticamente las unidades en las que consiste el sistema Spectramass PC2000. El sistema de vacío utiliza una bomba turbomolecular, precedida por a dos bombas rotatorias, para conseguir un descenso rápido de presión desde niveles de presión atmosférica. Los iones son enfocados a través del analizador cuadrupolar, el cual los separa de acuerdo a la relación masa/carga antes de la detección en un detector de iones directo (tipo Faraday) o un multiplicador de electrones secundario (SEM).

La presión puede ser inicialmente reducida desde 3 bar hasta aproximadamente 1 mbar utilizando una conducción capilar. De esta manera es posible llegar a tener tiempos de respuesta menores de 100 ms. Los efectos de condensación en el capilar aumentan el posible tiempo de respuesta de las señales. El capilar está provisto de una camisa calefactora la cual consigue que la temperatura de operación sea de aproximadamente unos 75° C. Esto reduce la aparición de vapores susceptibles de condensación sobre las paredes del capilar y mejora los tiempos de respuesta.

Las conducciones del gas de salida y de calibración, se insertan en el distribuidor-colector con la entrada seleccionada conectada al espectrómetro. Las electroválvulas se utilizan para seleccionar automáticamente el canal de análisis deseado. Esta tarea está dirigida por el sistema integrado por Spectramass.

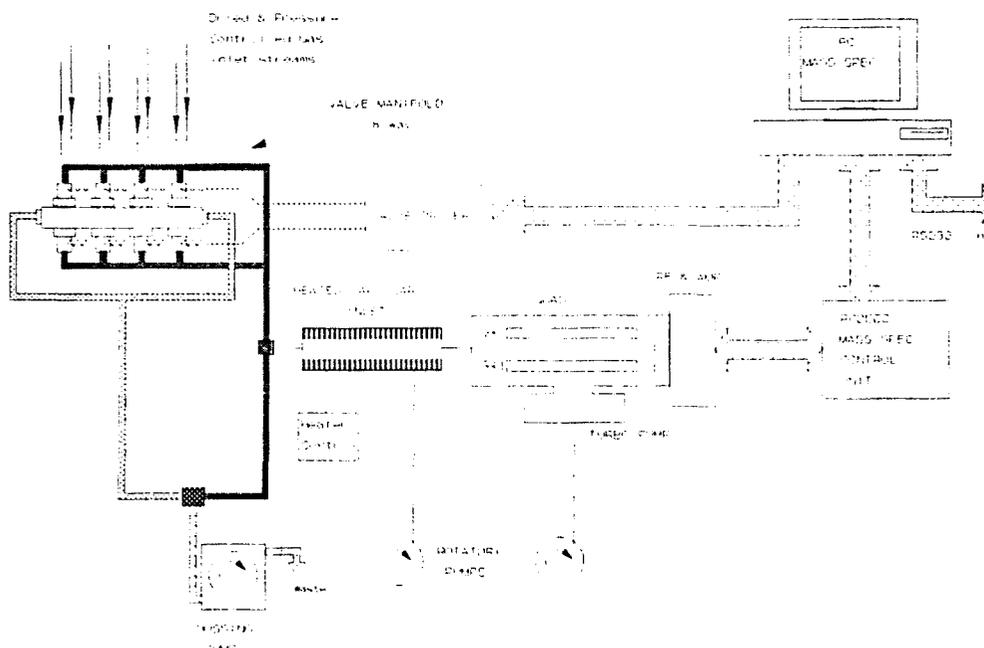


Figura 4.43. Esquema del espectrómetro de masas.

#### *Programa desarrollado para el espectrómetro de masas.*

El programa ha sido desarrollado en un lenguaje de alto nivel (C++), el cual permite posibilidades de comunicación con el software de Spectramass. En la figura 4.44 se puede ver la descripción esquemática del programa. El ordenador lee las composiciones de todos los componentes y el caudal de gas cada 15 s (debido al tiempo mínimo necesario para el análisis). Se realizan medias cada dos medidas con un intervalo de 30 s. Estos valores son utilizados en intervalos de 5 min para calcular los valores de las variables claves de la fermentación. Estos valores son igualmente integrados a lo largo de todo el proceso para cálculos ocasionales/opcionales de balances de materia totales. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la velocidad



de producción de dióxido de carbono (CER) se han descrito anteriormente en el apartado de análisis de gases.

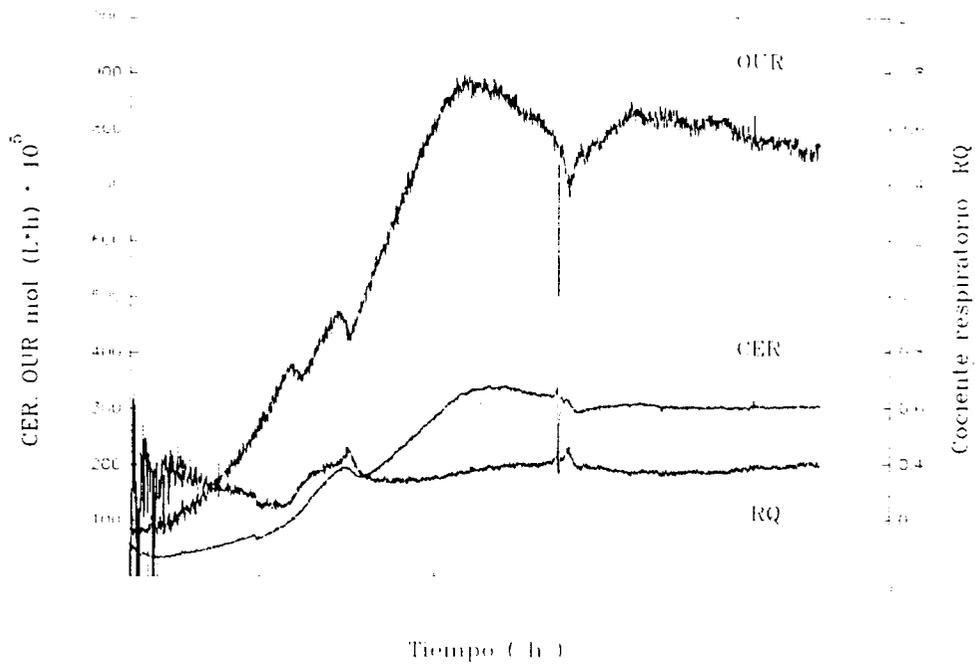
Dos de las ocho líneas de entrada al espectrómetro están conectadas a un montaje común con la entrada seleccionada conectadas a la línea de muestra y de gas de calibrado. Las recalibraciones se realizan para evitar efectos de deriva de señal y mejorar la exactitud y se llevan a cabo gracias al sistema de electroválvulas aportado por Spectramass. El tiempo de purga necesario cuando se efectúa un cambio de canal de entrada dependerá de las condiciones de operación, pero para los caudales normalmente utilizados, presiones de trabajo y composiciones, se ha fijado en unos 30 s. En el proceso de calibración se toman 3 medidas, haciendo una media siempre que cumplan la restricción de quedar todas incluidas en el intervalo de la desviación estándar. Con este criterio tan restrictivo, el proceso de calibrado se realiza con alta fiabilidad, ya que se evitan pequeñas perturbaciones del sistema de análisis o malfuncionamiento puntual del aparato.

Debido a los posibles ruidos de media y perturbaciones, se ha considerado oportuna la implementación de un filtro digital. Los filtros son utilizados a menudo para mejorar las señales mediante la eliminación de componentes indeseables presentes en ellas. Dada a la limitada frecuencia de análisis, es conveniente diseñar adecuadamente un filtro digital, ya que al no disponer de muchas medidas por segundo no es aconsejable realizar medias.

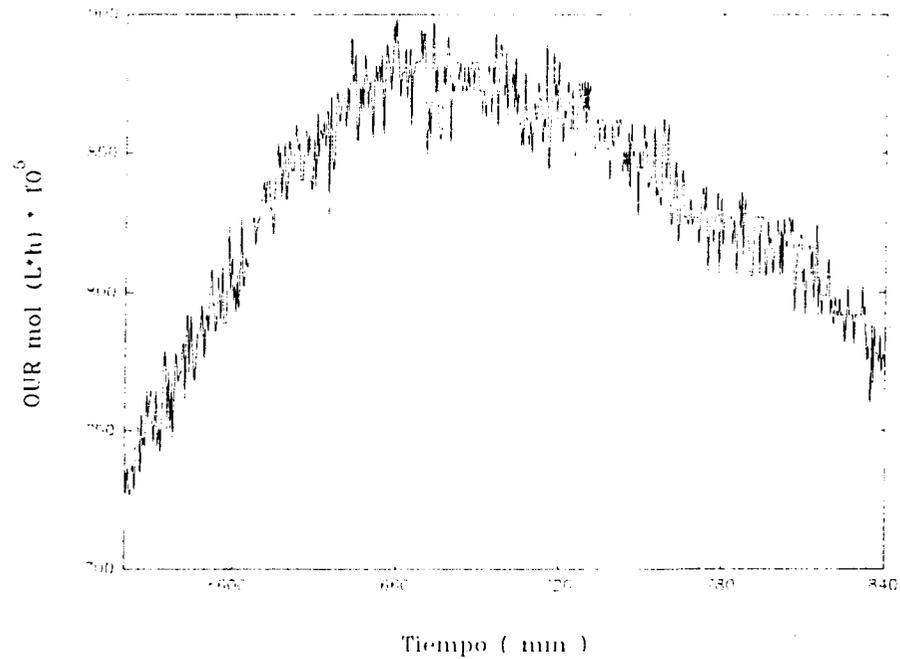
Con este software se ha conseguido resolver con éxito los problemas de aplicación en procesos de fermentación que presentaba el equipo disponible (Spectramass PC 2000), debido a dificultades de comunicación, conexión y de software, consiguiendo además subsanar la fuerte deriva de señal observada mediante una técnica de recalibración adecuada.

### *Tratamiento de señales*

Filtrado de CER, OUR y RQ. Debido a la máxima frecuencia de muestreo que se puede obtener en el análisis de gases ( $T=15$  s) y a que la señal va evolucionando a lo largo del tiempo, no se puede eliminar el ruido de la señal tan solo realizando un número considerable de barridos o análisis, y haciendo un promediado de señal. Se tendrá que recurrir a las técnicas de filtrado digital de boxcar de ventana móvil. La calidad de la señal se puede observar en la figura 4.45 en donde se presenta un experimento de fermentación con las medidas de CER, OUR y RQ con una considerable componente de ruido. De estas tres señales, debido a los motivos ya descritos anteriormente, la señal más ruidosa es la OUR (en consecuencia también la RQ), y por ello el filtro se diseñará en base a ésta. La mayoría de los filtros son utilizados frecuentemente para mejorar señales y eliminar componentes no deseables de ellas. El filtro más utilizado es el llamado de frecuencia selectiva,



**Figura 4.45.** Señales de CER, OUR y RQ en bruto correspondientes a una fermentación típica de arranque a un proceso en continuo.



**Figura 4.46.** Medida de OUR en bruto mostrando la relación señal/ruido.

diseñado a partir de las especificaciones de respuesta de frecuencia, lo cual permite que tan sólo pasen ciertas frecuencias deseadas. Los filtros también pueden ser utilizados para representar la dinámica de un sistema. En este caso el diseño del filtro, es un problema inverso: dados unos datos de entrada y salida, se puede encontrar que tipo de filtro puede reproducir mejor la relación obtenida entrada-salida (Identificación de sistemas).

Siendo  $X$  el vector de entradas o medidas, e  $Y$  el de salidas tal que:

$$X = ( X_n , X_{n-1}, \dots, X_{n-nb} )$$

$$Y = ( Y_n , Y_{n-1}, \dots, Y_{n-nb} )$$

El filtro digital está descrito por vectores  $a$  y  $b$  para crear los datos filtrados  $Y$ , a partir de los datos  $X$ . La estructura del filtro es la siguiente ecuación en diferencias:

$$y[n] = b(1)x[n] + b(2) x[n-1] + \dots + b(nb+1) x[n-nb] \\ - a(2) y[n-1] - \dots - a(na+1) y[n-na]$$

En esta ecuación se puede observar que el nuevo dato filtrado depende de los "nb" datos medidos anteriormente y el actual, según una matriz de coeficientes  $b$  o pesos, y de los "na" datos ya filtrados según un vector de coeficientes  $a$ . Los elementos de los vectores  $a$  y  $b$  se llaman coeficientes del filtro y el  $\max(na, nb)$  es el orden del filtro.

Cuando se filtra un número pequeño de datos, puede ser importante fijar las condiciones iniciales para evitar efectos transitorios iniciales. Cuando se tenga un número mayor de datos, normalmente es suficiente con despreciar los primeros puntos filtrados, corruptos por los efectos transitorios iniciales o de extremo.

En el caso de utilizar los filtros de respuesta de impulso finita (FIR), es posible diseñar filtros de fase lineal que, cuando se aplican normalmente a los datos, simplemente se obtiene un retardo de los datos filtrados por un número fijado de puntos, que es función del orden del filtro.

Se dan diferentes nombres a los filtros dependiendo de los valores de  $na$  y  $nb$ , si son iguales a 0 o no.

a)  $nb=0$ . Filtro de impulso infinito (IIR), All-pole, Recursivo/Autorregresivo (AR). El dato filtrado depende del dato actual y de los anteriormente ya filtrados.

b)  $na=0$  Filtro de impulso finito (FIR), All-zero, No recursivo, o de media móvil (MA). Los datos filtrados no dependen de los filtrados anteriormente.

c)  $na < 0$  ,  $nb < 0$  IIR, Pole-zero/Recursivo, Autorregresivo de media móvil (ARMA).

Los nombres AR, MA y ARMA son utilizados frecuentemente en conexión con procesos de filtrado estocástico. Los filtros digitales con duración finita de impulso de respuesta (FIR) tienen varias ventajas y desventajas comparándolos con los IIR.

Las ventajas son:

- Pueden tener exactamente fase lineal.
- Son siempre estables.
- Los métodos de diseño son generalmente lineales.
- Se pueden realizar eficientemente en "hardware".
- El efecto transitorio de arranque del filtro tiene duración determinada (finita).

Las desventajas son:

- Requieren un mayor orden del filtro que los IIR para conseguir un determinado nivel de eficacia.

Por todo esto, es por lo que se ha decidido utilizar un FIR en vez de un IIR. Además se ha demostrado que utilizar un IIR puede falsear la información debido a utilizar datos ya filtrados para obtener los siguientes.

Una vez determinada la necesidad de utilizar un filtro, y especificado su tipo; habrá varias maneras para poder especificar sus condiciones y diseñarlo. Hará falta un mínimo de información acerca de éste, como por ejemplo la frecuencia de muestreo disponible, la forma del filtro, frecuencias de corte, etc. Las diferentes técnicas de diseño de filtros se diferencian principalmente en el tipo de prestaciones que se desean. Por ejemplo en nuestro caso se necesita un filtro que tan solo deje pasar las frecuencias bajas, o sea, que interesan las tendencias o evoluciones claras y no variaciones instantáneas (15 s) de la señal. El filtro que se ha de utilizar será por tanto un filtro de paso-bajo.

Es necesario entonces especificar la frecuencia de corte, el orden del polinomio y la frecuencia de muestreo. Para realizar el diseño del filtro se ha utilizado el paquete de software MATLAB™ (1988). Se ha considerado que por su simplicidad y efectividad el método a implementar sea el método clásico de fase lineal con una ventana determinada para un FIR.

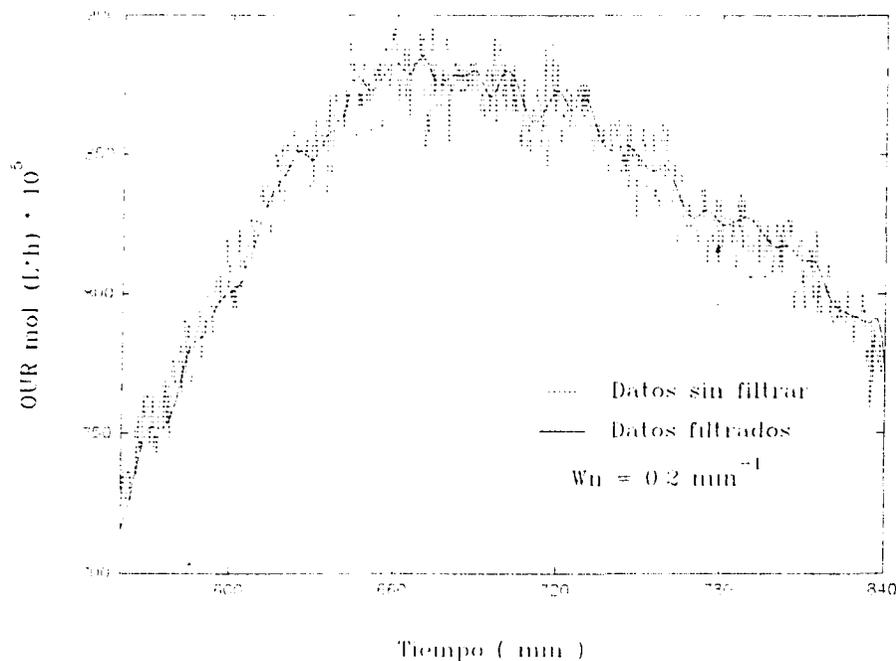
La instrucción propia de MATLAB que se utiliza es:  $b = \text{fir1}(n, Wn)$  la cual retorna el vector  $b$  conteniendo los  $(n+1)$  coeficientes del FIR filtro de orden  $n$  de paso bajo con ventana de tipo Hamming y fase lineal. La frecuencia de corte viene fijada por  $Wn$ , la cual representa el cociente

entre la frecuencia de paso deseada y la mitad de la mitad de la frecuencia de muestreo:  $W_n = W/(W_s \cdot 0.5)$ .

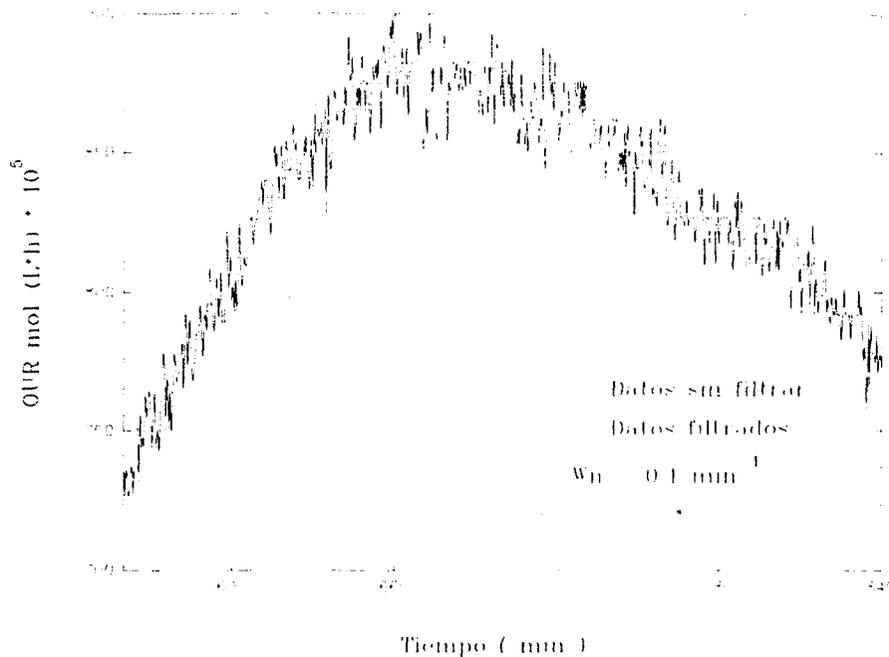
Los coeficientes del filtro vienen dados en orden descendiente de las potencias de  $z$ , en el dominio de frecuencia:  $b(z) = b(1) + b(2) z^{-1} + \dots + b(nb+1) z^{-n}$

En nuestro sistema es posible tomar análisis como mucho cada 15 s, pero se realiza una media cada 2 datos con lo que el periodo de muestreo efectivo es de  $30 \text{ s} = 0.5 \text{ min}$ . De esta forma la frecuencia de corte será  $W_n = W/1$ . Como medida conservativa se ha escogido el orden del filtro como aquel necesario para utilizar  $(n+1)$  datos según  $W_n = W = W_s/(n+1)$ . De hecho en el sistema a implementar interesa como mucho, que la frecuencia de corte sea la equivalente a unos 5 ó 10, min, porque una frecuencia mayor sería excesiva y menor aportaría demasiadas oscilaciones. Entonces la frecuencia de corte se fijará en el orden de  $W = W_n = 0.2 - 0.1 \text{ min}^{-1}$ .

Se han probado filtros FIR de paso bajo con orden 9, o sea que utilizan 10 datos, que parece ser un valor aceptable, y además con diferentes frecuencias de corte en el intervalo  $W_n = 0.1$  hasta  $0.2 \text{ min}^{-1}$  tal como se observa en las figuras 4.47 y 4.48. En el programa general desarrollado implementado en el PC central, los datos son archivados y representados cada 5 min como una de las opciones de filtrado de datos; por lo tanto al escoger  $n=9$  y utilizar 10 datos, se tiene que cada nuevo



**Figura 4.47.** Implementación de un filtro FIR de paso-bajo con  $W_n = 0.2 \text{ min}^{-1}$ .



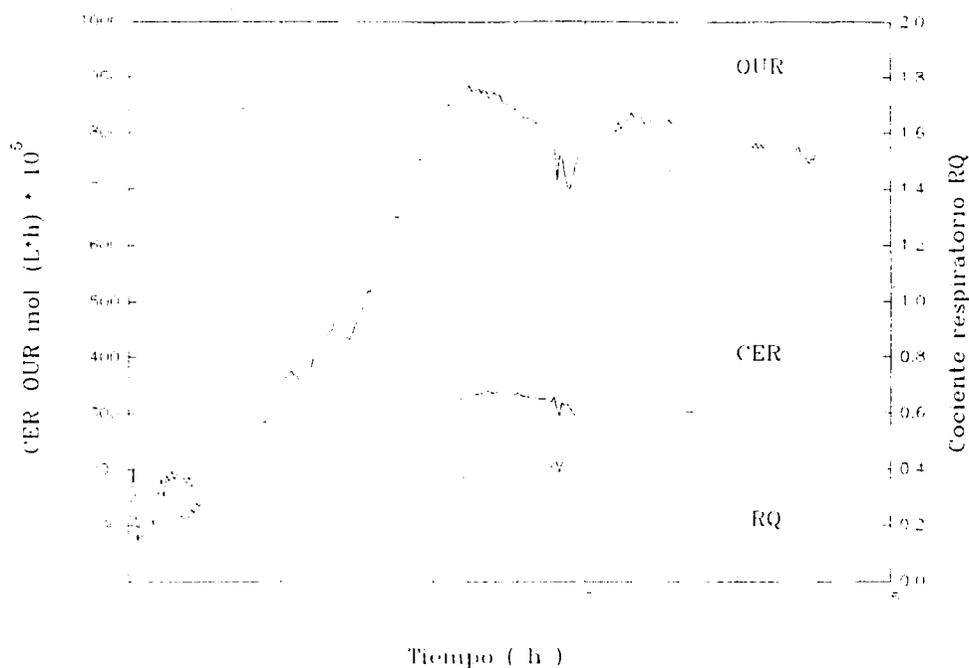
**Figura 4.48.** Implementación de un filtro FIR de paso bajo con  $W_n = 0.1 \text{ min}^{-1}$ .

dato no depende de ninguno de los utilizados para el valor filtrado anteriormente.

A priori, la elección más adecuada parece ser la de  $W_n = 0.2 \text{ min}^{-1}$ , ya que permite eliminar componentes indeseables de la señal por debajo de 5 min. Si se tomara  $W_n = 0.1 \text{ min}^{-1}$  se observarían fundamentalmente tendencias a partir de 10 min, parece un poco excesivo para el sistema.

Debido a la dinámica del proceso el tiempo de retardo aportado por el filtro, no sería muy importante al utilizarlo en tiempo real, ya que, por ejemplo, tomar decisiones de control a partir del análisis de gases con un posible retardo de unos 5 min o menor no sería trascendental.

El resultado del proceso final de filtrado de las señales de CER, OUR y RQ se puede observar en la figura 4.49, con un resultado excelente, ya que ha sido capaz de eliminar prácticamente todas las componentes de ruido presentes en la señal real. Por tanto, el método utilizado ha demostrado ser un método adecuado y susceptible de ser empleado en este tipo de sistemas.

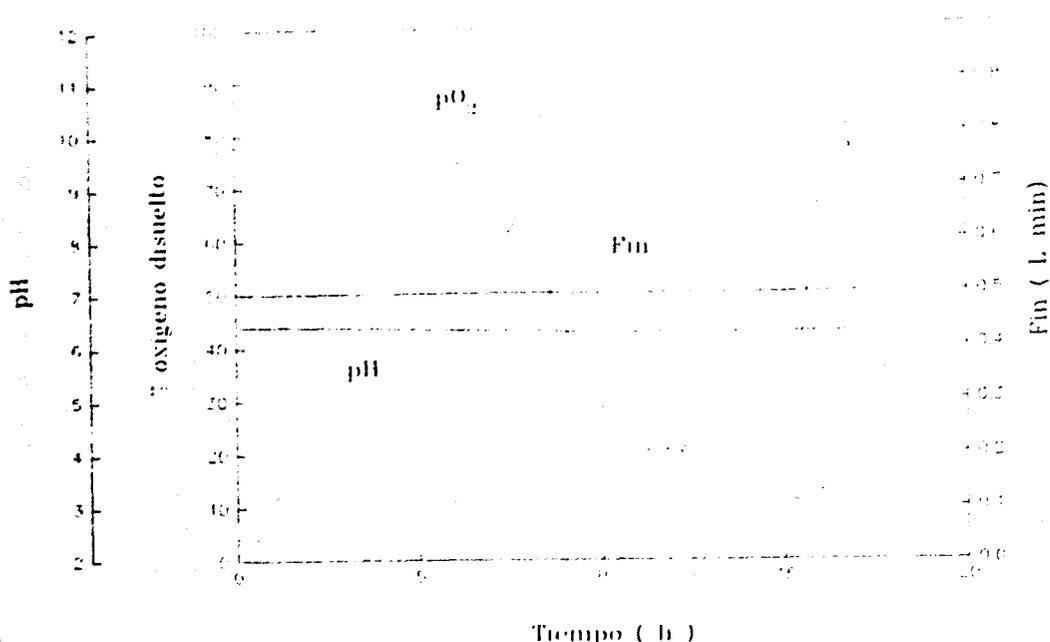


**Figura 4.49.** Resultado final del filtrado para las señales de CER, OUR y RQ.

#### Filtrado de otras variables.

En el caso de las demás variables de fermentación medidas, tales como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, velocidad de agitación y flujo de aire de entrada, no se ha considerado necesaria la aplicación de técnicas de filtrado, debido a que la frecuencia de muestreo disponible era muy elevada, del orden de unas 500 por segundo. Por ello lo que se ha hecho es realizar un promediado de señal, aprovechando la alta frecuencia de muestreo disponible, que las señales no son muy variables en el tiempo, no se tienen limitaciones de memoria importantes y que el ruido tienen un carácter fundamentalmente aleatorio.

El procedimiento es realmente sencillo y consiste en adquirir repetidamente la señal un número de veces, sumando cada nueva adquisición a la resultante de barridos anteriores y, finalmente dividir la suma por el número de adquisiciones efectuadas. En la figura 4.50 se puede observar un experimento típico de fermentación sin componente apreciable de ruido en ninguna de las señales.



**Figura 4.50.** Variables filtradas según la técnica del promediado de señales en una fermentación típica.

#### 4.3.3. Estimación de variables de estado y parámetros.

Las técnicas de estimación de estado son muy útiles en la monitorización y control de bioprocesos, debido a que las principales variables que describen el estado de los procesos biotecnológicos, tales como la biomasa y la concentración de sustrato son difíciles de medir en línea y a tiempo real. La idea básica de estas técnicas reside en combinar medidas indirectas, como los análisis de gases a la salida del fermentador, con un modelo dinámico del proceso, para poder calcular, o más rigurosamente estimar, las variables de estado difíciles de medir. Las técnicas de estimación han sido empleadas por numerosos autores (Kalman y col. 1961, Jazwinski 1970, Ljung 1983) que han profundizado en desarrollos teóricos de estos métodos. Alrededor de los últimos 10 años, las primeras aplicaciones de técnicas de estimación a bioprocesos han sido publicadas (Stephanopoulos y col. 1984), y desde entonces se pueden encontrar numerosas publicaciones sobre el tema (Bellgardt y col. 1986, Flaús y col. 1989, Valero y col. 1990, Bastin y col. 1990).

Los bioprocesos están caracterizados por ser en general sistemas no-lineales y variables en el tiempo (dinámicos), para los cuales la teoría de control clásica no provee algoritmos de estimación estándares para sus problemas específicos. Las dos grandes metodologías a seguir para la estimación de estado de los bioprocesos, son : utilizar las herramientas propias de la teoría de control lineal aplicadas a una linealización local del modelo del proceso o bien diseñar un método específico para un modelo de bioproceso en concreto. El segundo método es fácil de utilizar, produciendo buenos resultados, con el inconveniente de estar limitada su aplicación para casos muy específicos. El primero es más general, pero debido a que trabaja con una aproximación del modelo, puede llegar a producir resultados incorrectos.

En primer lugar, se ha considerado el problema de la estimación de estado, estudiando la aplicación de métodos que van desde la integración directa hasta observadores. Posteriormente, se han evaluado técnicas de estimación de estado y parámetros conjuntamente, aplicando métodos de tipo estocástico, como el Filtro de Kalman Extendido (EKF) y el método Recursivo de Error de Predicción Recursivo (RPE).

### *Bases matemáticas*

Si se supone que en el bioproceso (crecimiento celular) a estudiar existe un sustrato limitante el modelo dinámico del sistema, basado en balances elementales de materia, es:

$$\begin{aligned} dX/dt &= (\mu(S) - D(t)) X(t) \\ dS/dt &= - Y_{sx} \mu(S) X(t) + D(t) (S_{in} - S(t)) \end{aligned}$$

donde  $X(t)$  es la concentración de biomasa,  $S(t)$  la concentración de sustrato,  $D(t)$  la velocidad de dilución,  $\mu(S)$  la velocidad específica de crecimiento,  $Y_{sx}$  el rendimiento de consumo de sustrato respecto de la producción de biomasa, que se supone constante y  $S_{in}$  la concentración de sustrato en la entrada al fermentador.

En este modelo el vector de estado estará formado por las variables sustrato y biomasa  $\mathbf{x}(t) = [X(t), S(t)]^T$ , siendo la variable de entrada, cuando el fermentador trabaja en modo semi-continuo y continuo la velocidad de dilución  $D(t)$ . La velocidad de dilución viene dada por  $D(t) = F_{in}(t)/V(t)$ , donde  $F_{in}$  es el caudal de entrada del alimento y  $V$  el volumen del cultivo. Cuando

$D(t)=0$  para todo tiempo, el sistema operará en modo discontinuo, mientras que si  $F_{in}$  (ó  $V$ ) es variable se operará en modo semicontinuo, y el proceso en continuo se da cuando tanto  $F_{in}$  como  $V$  sean constantes.

La velocidad específica de crecimiento  $\mu$  depende de la concentración de sustrato limitante siendo la expresión más comunmente utilizada la ecuación de Monod :  $\mu(S) = \mu_m S/(K_s + S)$ .

Si se discretiza el modelo propuesto, siguiendo el método de Euler como método más sencillo, se tiene:

$$S(t+1) = - T_s Y_{sx} \mu(S) X(t) + T_s D(t) (S_{in} - S(t))$$

donde  $T_s$  es el tiempo de muestreo.

Será imprescindible proponer o fijar un modelo de medida, o ecuación genérica de medida, para representar la relación entre las variables de estado y la medida indirecta. La mayoría de las veces las variables que se relacionan con la concentración de biomasa viable son la velocidad de producción de dióxido de carbono (CER) o la velocidad de consumo de oxígeno (OUR).

Debido a que la OUR tiene más problemas de ruido y perturbaciones que la CER, es esta última que se utiliza como medida indirecta para el modelo de medida.

La ecuación genérica de medida se construye de la forma:

$$y(t) = (a \mu(S) + b) X(t)$$

ecuación que en el apartado correspondiente a experimentos en cultivo continuo se confirmó como válida tanto para la medida de CER, como de OUR.

$$\text{CER}(t) = (A \mu + B) X(t) \quad A = 1309 \quad B = 32.8$$

$$\text{OUR}(t) = (A' \mu + B') X(t) \quad A' = 3173 \quad B' = 68.6$$

Estos parámetros pueden ser encontrados igualmente por minimización del residuo (mínimos cuadrados) previa integración directa de la señal para obtener la  $X(t)$ , de experimentos en semicontinuo anteriores o de calibrado del modelo de medida.

*Estimación de variables de estado.*Método de integración directa.

Si suponemos que la concentración de biomasa viable está relacionada con la velocidad de producción de gas (CER) de la siguiente forma:  $y(t) = (a \mu + b) X(t)$  donde la función  $\mu$  es desconocida, y además se supone que  $a > 0$ ,  $b \geq 0$ .

La evolución de la concentración de la biomasa, expresada como ecuación en diferencias, será de la forma :

$$X(t+1) = (1 + T_s (\mu - D(t))) X(t)$$

que, combinan con la de medida conduce a:

$$y(t) = a (X(t+1) - X(t))/T_s + a D(t) X(t) + b X(t)$$

la cual puede ser reescrita de la forma:

$$X(t+1) = (1 - T_s D(t) - T_s (b/a)) X(t) + (T_s/a) y(t)$$

de manera que con el valor inicial de la concentración de biomasa, es posible estimar la evolución de la biomasa mediante la medida  $y(t)$ , en este caso CER(t). Como caso particular de esta ecuación, se tiene el caso en que  $b=0$ , o sea que la velocidad de producción sea tan sólo proporcional al crecimiento y no también a la biomasa (el coeficiente  $b$  tiene relación directa con un coeficiente de mantenimiento). Si además se trata de una operación en modo discontinuo  $D=0$  con lo que la expresión se reduce a una del tipo :  $X(t+1) = X(t) + (T_s/a) y(t)$ , que no es más que la forma integral para calcular la biomasa a partir de la medida indirecta de la CER.

Este método tiene como ventajas el ser de fácil implementación y no necesitar ningún tipo de sintonía (búsqueda adecuada) de parámetros. Cuando los valores iniciales de la biomasa y substrato son conocidos, y no se produce ninguna perturbación en el sistema, se obtienen resultados muy buenos tal como se muestra en la figura 4.51 correspondiente a una fermentación de *Candida rugosa* utilizando ácido oleico como fuente de carbono. Tal como se observa en la figura, las medidas discretas de biomasa están en buena concordancia con los valores estimados.

No obstante, hay que tener en cuenta que el método es sensible a errores de inicialización (valores iniciales) y no es capaz de compensar perturbaciones en la medida indirecta. Un ejemplo de errores de inicialización se puede ver en la figura 4.52, en la cual se aporta un valor inicial de la biomasa erróneo, lo que conlleva que al principio se tenga un error relativo grande en la estimación

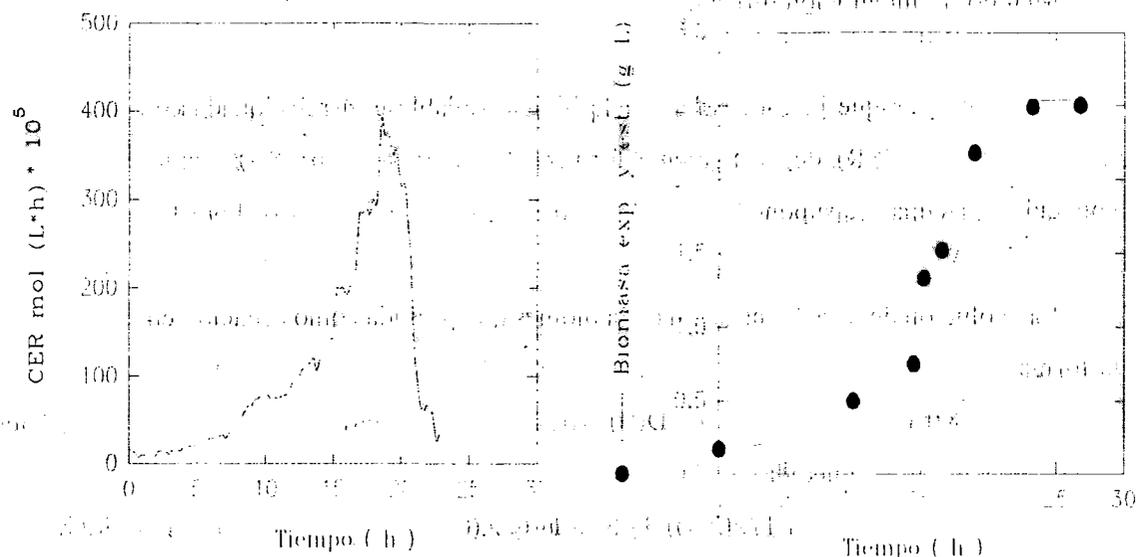


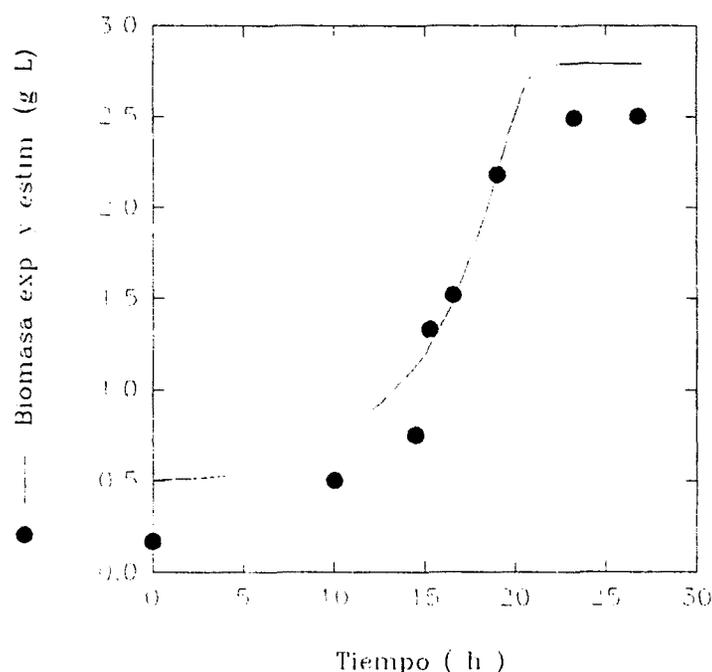
Figura 4.51. Estimación de la biomasa utilizando integración directa.

y posteriormente, aún manteniéndose el error absoluto o de "offset" vaya disminuyendo el error relativo, conforme aumenta la biomasa. Este efecto no es tan importante en semicontinuo o continuo, ya que debido a la dinámica del proceso, el error de inicialización acaba por no contribuir en la estimación.

#### Observadores

Para conseguir mejores resultados en la estimación, es decir poder compensar los errores de inicialización y las perturbaciones, la solución es utilizar los llamados observadores. Este tipo de algoritmo combina el conocimiento a priori del sistema dado por el modelo de estado con las medidas en línea, para conseguir mejorar la calidad de la estimación (Ljung 1983). Por ejemplo utilizando la ley de Monod para describir la velocidad específica de crecimiento se tiene:

$$\begin{aligned} X(t+1) &= (1 + T_s (\mu - D(t))) X(t) \\ S(t+1) &= -T_s Y_{sx} \mu(S) X(t) + T_s D(t) (S_m - S(t)) \\ \mu(S) &= \mu_m S / (K_s + S) \end{aligned}$$



**Figura 4.52.** Estimación de la biomasa utilizando integración indirecta con un error de inicialización.

Para este modelo el observador correspondiente se podría escribir de la forma:

$$X_e(t+1) = (1 + T_x (\mu(S_e(t)) - D(t))) X_e(t) + K_x (y(t) - y_e(t))$$

$$S_e(t+1) = -T_x Y_{sx} \mu(S_e(t)) X_e(t) + T_x D(t) (S_{in} - S_e(t)) + K_s (y(t) - y_e(t))$$

$$y_e(t) = (a \mu(S_e(t)) + b) X_e(t)$$

donde el subíndice e denota el valor estimado de la variable correspondiente.

Básicamente, estas ecuaciones son las mismas del modelo, en las cuales se ha introducido un término corrector que depende del error entre la salida o medida predicha y el valor medido experimental  $E(t) = y(t) - y_e(t)$ . El error está multiplicado por una ganancia  $K = [K_x \ K_s]$ . La selección del valor de la ganancia es bastante difícil y debería estar basado en el análisis de estabilidad y convergencia del algoritmo. La mayoría de las veces, esta ganancia se determina mediante tanteo en simulaciones previas. Puede ser escogida, para que el sistema sea estable y más concretamente, para que el algoritmo converga (error de estimación despreciable) lo antes posible. En la figura 4.53 se muestra el funcionamiento de un observador, en la que se observa un comportamiento aceptable.

La función de un observador es combinar el conocimiento sobre el sistema que se expresa mediante el modelo con la información dada por las medidas en línea. Es evidente, que si el modelo no es suficientemente bueno, esto producirá errores más o menos importantes en la estimación.

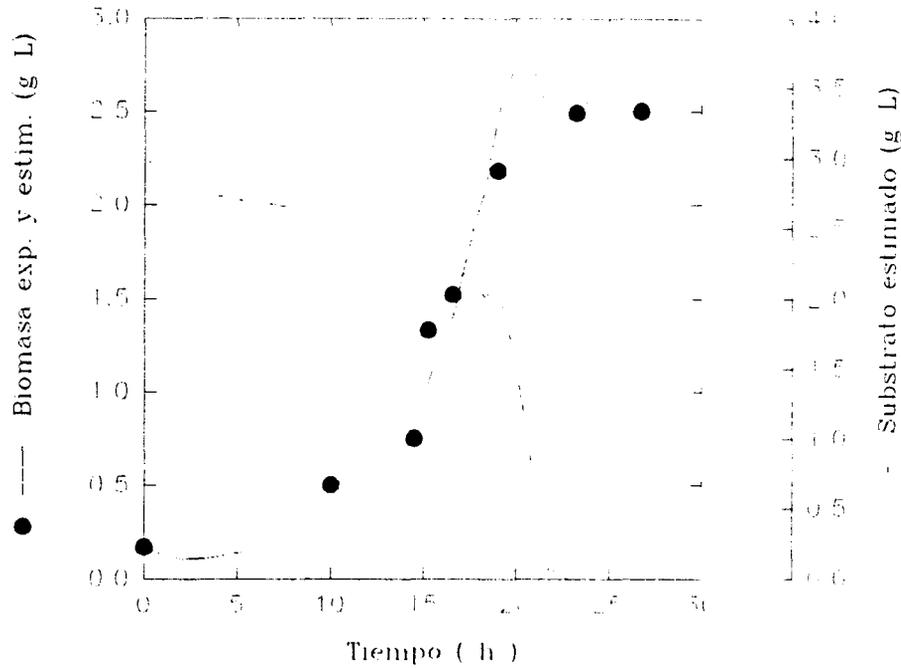


Figura 4.53. Estimación de sustrato y biomasa utilizando un observador.

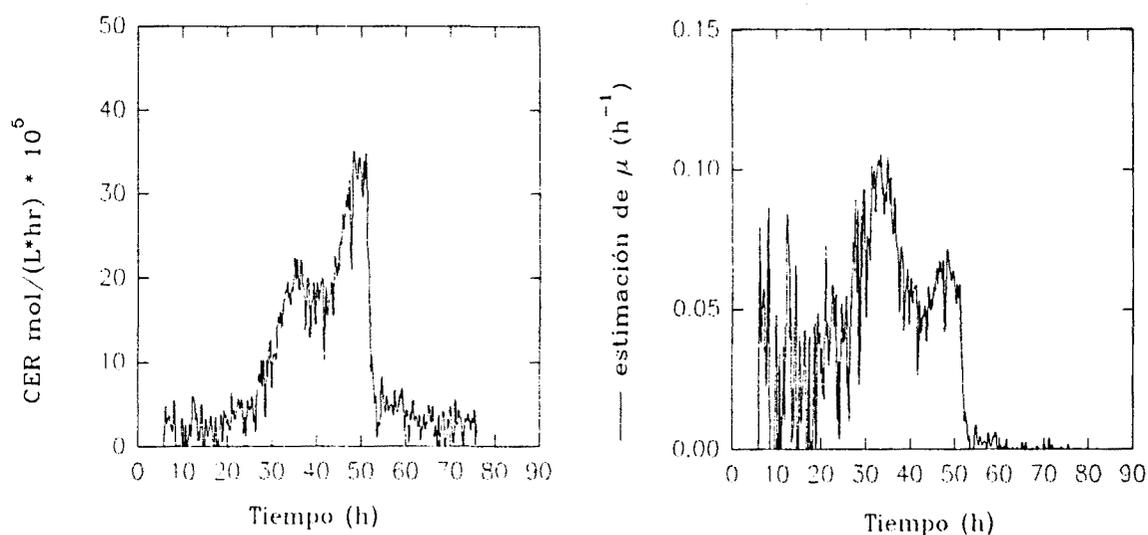
#### Estimación de variables de estado y parámetros conjuntamente.

Al igual que el método de integración directa se puede utilizar para calcular la biomasa a partir de una medida indirecta, la velocidad específica de crecimiento puede ser expresada como función de la derivada de la biomasa. Para el modelo genérico de un bioproceso que se considera, la biomasa y la velocidad específica de crecimiento se pueden expresar como:

$$X(t+1) = (1 + T_s (\mu - D(t))) X(t)$$

$$\mu(t) = (X(t+1) - X(t)) / (X(t) T_s) + D(t)$$

Esta forma de obtener la  $\mu(t)$  es muy fácil de implementar, pero desgraciadamente los métodos basados en diferenciación directa no funcionan correctamente, debido a ser muy sensibles al ruido de la señal utilizada. Este hecho se puede ver claramente en la figura 4.54, en la que la estimación de la velocidad específica de crecimiento se ve muy afectada por el ruido de la señal, y por tanto no se obtienen resultados aceptables. Además este método no puede ser aplicado a cualquier parámetro, sino tan sólo a aquellos que pueden ser expresados como una función de una variable de estado conocida (en este caso se estima por otro método anterior). De esta manera este método de derivación directa no debería de ser utilizado en ninguna ocasión.



*Figura 4.54. Estimación de la velocidad específica de crecimiento utilizando un método de derivación directa.*

#### Filtro de Kalman Extendido

Si se vuelve a considerar el modelo genérico de un bioproceso para el cual se desea estimar la concentración de biomasa, la concentración de sustrato y la velocidad específica de crecimiento a partir de la velocidad de producción de dióxido de carbono:

$$\begin{aligned} X(t+1) &= (1 + T_s (\mu - D(t))) X(t) \\ S(t+1) &= -T_s Y_{sx} \mu(S) X(t) + T_s D(t) (S_{in} - S(t)) \\ y(t) &= (a \mu(S) + b) X(t) \end{aligned}$$

La velocidad específica de crecimiento se supone desconocida. Entonces, si se considera  $\mu$  como un parámetro variable en el tiempo, que debe ser estimado, el primer paso para aplicar el Filtro de Kalman es ampliar el vector de estado para incluir los parámetros (Valero y col. 1990):  $x_e(t) = [X(t), S(t), \mu(t)]$ .

Para construir el modelo extendido asociado al estado ampliado, se utiliza el modelo inicial y se hace la suposición de que el parámetro es constante:

$$x_e(t+1) = [X(t+1), S(t+1), \mu(t+1)] = f(X, S, \mu, D) = [f_1(X(t), D(t), \mu(t)), f_2(X(t), S(t), D(t), \mu(t)), \mu(t)]$$

$$y_e(t) = h(x_e(t))$$

El Filtro de Kalman se desarrolló para sistemas lineales, por lo que para aplicarlo a sistemas no lineales, como es el que caso que nos ocupa, se ha de modificar a partir de la versión lineal, como sigue:

$$x_e(t+1) = f(x_e(t), D(t)) + K(t) (y(t) - h(x_e(t)))$$

$$K(t) = F_e(t) P(t) H_e(t) (H_e(t) P(t) H_e^T(t) + R)^{-1}$$

$$P(t+1) = P(t) + F_e(t) P(t) F_e^T(t) + Q - K(t) (H_e(t) P(t) H_e^T(t) + R)^{-1} K_e^T(t)$$

en donde  $F_e(t) = df(x_e, D)/dx_e |_{x_e=x_e(t)}$ ,  $H_e(t) = dh(x_e, D)/dx_e |_{x_e=x_e(t)}$ ,  $R$  la matriz de covarianza de ruido, y  $Q$  la matriz de covarianza del proceso.

Las ecuaciones del Filtro de Kalman Extendido son las ecuaciones del modelo con un término adicional, el cual es proporcional al error de estimación  $E(t) = y(t) - h_e(t)$ . La ganancia es calculada a partir de las ecuaciones recursivas lineales para el Filtro de Kalman en las cuales las matrices  $F$  y  $H$  son reemplazadas por las correspondientes linealizadas para el estado actual  $x_e(t)$ .

Uno de los principales problemas del Filtro de Kalman Extendido es la sintonía de los parámetros necesaria. Normalmente, se realiza mediante tanteo, si bien pueden establecerse una serie de reglas que permitan una selección más cómoda de estos parámetros de sintonía.

#### Método Recursivo de Error de Predicción (RPE)

Para un proceso descrito por un modelo lineal, el Filtro de Kalman aporta la mejor estimación de estado. El criterio para definir la mejor estimación es la varianza del error de estimación. Las propiedades del ruido son tomadas en cuenta y, la ganancia se calcula de forma que se minimice el error de estimación. Cuando el sistema es lineal la solución es entonces la óptima. Cuando el sistema es no lineal, el cálculo de la ganancia óptima no es posible, ya que se utiliza una aproximación del modelo para el estado actual o instantáneo.

El método RPE (Ljung 1993) utiliza un criterio diferente de optimalidad, y su interés radica en que la estimación de estado y parámetro se trata separadamente. El algoritmo estima los

parámetros  $\Theta$  tal que se minimiza el criterio  $V_n(\Theta) = \Sigma (E(t))^2$ . En esta expresión  $E(t)$  denota el error entre la predicción del modelo y la medida actual :  $E(t) = y(t) - y_c(t/\Theta)$ . Este método ha sido aplicado a procesos genéricos (Flaus 1989) para la estimación de biomasa y velocidad específica de crecimiento a partir de los análisis de gases de salida. El algoritmo es como sigue:

$$X_c(t+1) = (1 + T_s (\mu_c(t) - D(t))) X_c(t) + K(t) E(t)$$

$$y(t) = (a \mu_c(t) + b) X_c(t)$$

donde  $K(t)$  es la ganancia de Kalman. El algoritmo para la estimación de los parámetros es:

$$E(t) = y(t) - y_c(t/\Theta).$$

$$\mu_c(t+1) = \mu_c(t) + L(t) E(t)$$

$$L(t) = P(t-1)\tau(t) [R_2(t) + \tau(t)^T P(t-1)\tau(t)]^{-1}$$

$$P(t) = P(t-1) - P(t-1) \tau(t) [R_2(t) + \tau(t)^T P(t-1)\tau(t)]^{-1} \tau(t)^T P(t-1) + R_1(t)$$

donde  $L(t)$ : Ganancia de la estimación de parámetros

$P(t)$ : Covarianza del error de estimación de parámetros

$\tau(t)$ : Gradiente del error de predicción que es calculado recursivamente

$R_1(t)$  y  $R_2(t)$  son dos parámetros de sintonía.  $R_1(t)$  permite describir la mayor o menor velocidad de variación de  $\mu$ , mientras que  $R_2(t)$  tiene relación con el ruido de la medida utilizada en la estimación de  $\mu$  (Flaus 1989).

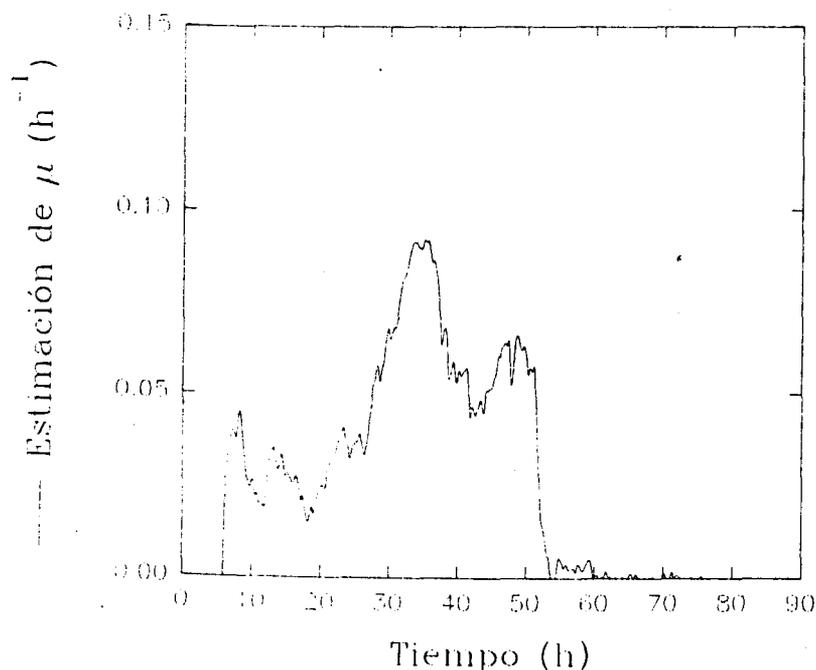


Figura 4.55. Estimación de la velocidad específica de crecimiento utilizando el método RPE.

Los resultados de la aplicación de este método se pueden observar en la figura 4.55. Debido a que en este algoritmo la sintonía de los parámetros ( $R_1(t)$  y  $R_2(t)$ ) es más fácil, se considera con este método se consigue una mejor estimación que con el Filtro de Kalman para el parámetro  $\mu$ , y en consecuencia, una mejor estimación para la biomasa. De todas formas, no es posible de corregir los errores de inicialización ya descritos anteriormente.

Comparando los resultados obtenidos utilizando el método RPE y la derivación directa, se observa que el método RPE permite una estimación de tipo más suave de la velocidad específica de crecimiento y por tanto es el método que se ha seleccionado para realizar la estimación de estado y parámetros en el sistema experimental de fermentación puesto a punto.

#### Comparación general de los diferentes métodos y criterios de selección.

En primer lugar se han considerado los métodos más sencillos, la integración y derivación directas, demostrándose que si bien el primer método es bastante eficiente, el método de derivación directa debe ser evitado. Posteriormente se han introducido técnicas más sofisticadas como los observadores o el Filtro de Kalman. Con estos métodos se ha visto que si se pudiera conseguir un filtrado del ruido de señal y alguna compensación de los errores de inicialización, estas mejoras repercutirían en la calidad del modelo de estado del bioproceso.

Una vez presentados los problemas de sintonía que presenta el Filtro de Kalman Extendido, se ha propuesto la alternativa de utilizar el método RPE, el cual puede simplificar este problema. A pesar de la mejora en los resultados de estimación, esto se consigue a costa de un gran aumento en la complejidad del algoritmo utilizado. Finalmente se ha seleccionado el método RPE debido a mostrar más ventajas en frente de los demás, ya que no se tienen problemas de restricción en la implementación del algoritmo a nivel de memoria, tiempo de cálculo, etc...