

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

#### **4.4. Modelización.**

Los métodos de modelización generan conjuntos de ecuaciones diferenciales y algebraicas, normalmente no lineales, que se obtienen a partir del estudio analítico del sistema.

La modelización genera representaciones de los sistemas que pueden tener un amplio rango de validez, al llevar incorporados los mecanismos básicos de funcionamiento de los procesos, pero al mismo tiempo suele ser una tarea larga que requiere experiencia y conocimiento de los sistemas.

La resolución de los conjuntos de ecuaciones diferenciales que normalmente se emplean para representar una amplia clase de procesos no puede hacerse, excepto en casos muy especiales, de forma analítica. Por ello ha de recurrirse a otros métodos o técnicas de solución para calcular la evolución en el tiempo de las variables que caracterizan el sistema bajo estudio.

Históricamente la primera herramienta que se empleó de forma bastante extendida fue el ordenador analógico. La principal ventaja de este método de resolver las ecuaciones fue la velocidad. Todas ellas se integraban en paralelo a la velocidad de operación de los circuitos, independientemente de su número. Sin embargo tiene también serios inconvenientes entre los que cabe destacar dos: la necesidad de efectuar cambios de escala en las variables de las ecuaciones para conseguir las correspondientes tensiones se encuentren en el rango de valores permitido por los circuitos, y la falta de precisión en muchas operaciones y, por tanto, en la solución.

La aparición del ordenador digital supuso un cambio drástico en cuanto permitía resolver fácilmente estos dos problemas y por ellos las técnicas de simulación digital han ido ganando terreno progresivamente. La base de estos métodos está en resolver las ecuaciones diferenciales del modelo que se desea simular por integración numérica, ofreciendo claras ventajas de exactitud, simplicidad y flexibilidad sobre el ordenador analógico. No obstante, en cuanto a velocidad, las técnicas digitales van siempre por detrás de las analógicas debido entre otros factores, a la naturaleza del computador que obliga a una resolución secuencial en lugar de paralela. Por ello, para obtener ventajas de ambas técnicas, desde los años 60 comenzaron a emplearse computadores híbridos que combinan un ordenador analógico y otro digital. La parte digital se emplea fundamentalmente para controlar y monitorizar la parte analógica, que es la encargada de resolver el problema.

Hoy en día, los computadores híbridos han llegado a alcanzar un grado de sofisticación elevado en el que la parte digital es capaz de traducir descripciones matemáticas del modelo al

conexión hardware de la parte analógica. Lenguajes de simulación orientados a computación híbrida son, por ejemplo, HYTRAN o ECSL. No obstante, este tipo de simulación está circunscrito a aplicaciones en las que se requiere una gran velocidad de proceso.

Cuando se dispone de un ordenador digital se puede resolver un sistema de ecuaciones diferenciales usando un lenguaje de alto nivel adecuado, tal como por ejemplo Fortran, para escribir un programa de simulación específico para el problema que se quiere resolver.

Sin embargo este es un proceso largo, que requiere conocimientos especiales de programación e integración de ecuaciones y que está expuesto al peligro de cometer numerosos errores.

Por ello desde muy temprano (los primeros datan de 1955), se han desarrollado programas especiales, denominados lenguajes de simulación digital, que liberan al usuario de numerosos detalles de programación, dan fiabilidad a los resultados y facilitan la realización de simulaciones. El usuario solo tiene que describir su modelo en forma especificada por el lenguaje y decir que tipo de operaciones desea realizar (Korn y col. 1978, Stephenson, 1971). El programa de simulación proporciona entonces los resultados en forma gráfica o alfanumérica.

Los elementos fundamentales de un lenguaje de simulación digital son los siguientes:

- La forma y elementos empleados para la descripción del modelo que se desea simular.
- Los métodos de integración de las ecuaciones diferenciales del modelo.
- La presentación de los resultados obtenidos.
- La especificación de los experimentos y condiciones en que se desea efectuar la integración.
- La relación con el mundo exterior al lenguaje de simulación.
- Las funciones adicionales que proporciona.

Un buen lenguaje debe facilitar la realización de estas tareas al usuario de modo que éste se limite a proporcionar información al sistema sobre lo que desea hacer sin tener que preocuparse de como hacerlo. De esta forma puede concentrarse en el problema y no en la programación necesaria para resolverlo. Algunos lenguajes están orientados a áreas específicas siendo de mayor interés para nuestra aplicación aquellos que están orientados a sistemas descritos por ecuaciones diferenciales, los cuales cubren un amplio rango y son, quizás los más generales.

Las necesidades de transportabilidad y la proliferación de programas impulsaron la formación de un comité de estandarización que finalmente publicó la norma conocida como Continuous Systems

Simulation Language (CSSL' 67) (Rimvall y col. 1985). Dicha norma ha tenido un profundo impacto en los lenguajes de simulación subsiguientes la mayoría de los cuales se han acomodado a sus recomendaciones.

El estándar CSSL' 67 contiene innovaciones esenciales en relación a los lenguajes tipo bloques que de una u otra manera se conservan en las formulaciones más modernas. Las principales se centran en :

- La forma de describir el modelo, que se hace en términos similares a la formulación matemática habitual.
- La estructuración temporal de dicha descripción, distinguiéndose regiones inicial, dinámica y temporal que se ejecutan al inicio, durante y tras haber transcurrido el tiempo de simulación.

El programa que realiza la simulación no efectúa esta procesando continuamente los datos que constituyen la descripción del modelo, sino que dicha descripción se utiliza para generar código en un lenguaje de alto nivel, por ejemplo Fortran, que una vez compilado y montado con las librerías que proporciona el sistema da origen a un código ejecutable que es quién resuelve el problema. El programa de simulación puede considerarse, por tanto más propiamente como un generador de lenguaje y unas librerías de utilidad.

El hecho de estar basado en un lenguaje de alto nivel estándar permite añadir fácilmente nuevas funciones e incluir código escrito en este lenguaje aumentando así las capacidades del lenguaje de simulación. La realización de los experimentos con el modelo, presentación de resultados, cambio de valores de los parámetros, etc. se hace utilizando un lenguaje de comandos que el usuario teclea interactivamente en el terminal del ordenador, lo que constituye un paso hacia la separación del modelo y experimento. Existen numerosos lenguajes que siguen en gran medida las especificaciones CSSL' 67 entre los que han tenido gran difusión se pueden mencionar el CSMP/360 y el DSL/VS de IBM, CSSL-IV, DARE-P. Pero de todos ellos quizás el más conocido y extendido es probablemente ACSL que es el utilizado a lo largo de este trabajo debido a su características especiales.

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

ACSL es un lenguaje de simulación basado en el estándar CSSL' 67 cuyas siglas son las correspondientes a Advanced Continuous Simulation Language. Este lenguaje ha sido diseñado para

modelizar y evaluar el comportamiento de sistemas continuos descritos por ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales que varían con el tiempo.

En el desarrollo de este lenguaje, se ha enfatizado la capacidad de ejecutar y evaluar el modelo en línea, con la posibilidad de introducir datos desde el teclado, imprimir datos o graficar por pantalla o plotter.

Fundamentalmente ACSL facilita el proceso de programar las ecuaciones representativas del modelo a utilizar, suministrando un lenguaje más próximo al usuario que no los lenguajes de programación de alto nivel. En este sentido, ACSL es el encargado de generar código FORTRAN77 a partir del lenguaje ACSL. Este código FORTRAN77 es posteriormente compilado para generar el programa ejecutable.

La estructura de un programa ACSL es la siguiente:

PROGRAM

    INITIAL

    Instrucciones procesadas antes de la ejecución de la simulación

    END

    DYNAMIC

        DERIVATIVE

        Instrucciones para calcular las derivadas en cada instante de tiempo. Son el conjunto de ecuaciones del modelo.

        END

        DISCRETE

        Instrucciones ejecutadas tan sólo a ciertos intervalos de tiempo (por ejemplo acciones de control, simulación de lectura de datos,...)

        END

        Instrucciones ejecutadas cada intervalo de comunicación con el sistema

    END

    TERMINAL

    Estas ecuaciones se ejecutan al final de la simulación.

    END

END

Además de las operaciones matemáticas más usuales, este lenguaje dispone de una librería de integradores de ecuaciones diferenciales que pueden ser seleccionadas por el usuario en función de las características del modelo. Las diferentes posibilidades son:

- 1.- Adams-Moulton, paso y orden variable.
- 2.- Gear, paso y orden variable. Apropiado para ecuaciones tipo "stiff".
- 3.- Runge-Kutta, primer orden.
- 4.- Runge-Kutta, segundo orden.
- 5.- Runge-Kutta, tercer orden.
- 6.- Runge-Kutta, cuarto orden.
- 7.- Integrador programado por el usuario dependiendo de las necesidades específicas.
- 8.- Runge-Kutta-Fehlberg, segundo orden.
- 9.- Runge-Kutta-Fehlberg, quinto orden.

Una buena referencia para encontrar más información sobre los algoritmos de integración de ecuaciones diferenciales ordinarias se puede encontrar en el libro de Davis (1984).

#### **4.4.2. Consideraciones cualitativas. Observaciones y estudios realizados.**

Para el desarrollo de un modelo matemático, de carácter dinámico que aglutine y organice toda la información del proceso se han investigado los mecanismos básicos de síntesis y excreción de la lipasa, de gran importancia en su elaboración. Este modelo será útil para la simulación del mismo, su control y, eventualmente, el cambio de escala.

Con la finalidad de obtener conocimientos para ayudar a elucidar dichos mecanismos, se han hecho una serie de estudios:

- Estudio del efecto de diferentes sustratos, en especial de ácidos orgánicos de número creciente de átomos de carbono, y de otros posibles inductores, a fin de saber si el inductor es el propio ácido oleico o bien algún metabolito intermediario del catabolismo del mismo. De los resultados obtenidos se puede concluir que es válido considerar el ácido oleico como inductor directo en la síntesis de lipasas cuando éste es utilizado como única fuente de carbono.

- Se ha seguido a lo largo de las fermentaciones la evolución de la lipasa intracelular, observando globalmente los fenómenos de síntesis y excreción. Inicialmente no se encuentra lipasa en el interior

de la célula, para ir aumentando, pasar por un máximo y disminuir hasta cierto valor. Ello nos indicaría, si bien no podemos afirmar que la lipasa no esté ya sintetizada como precursor, que la lipasa activa se produce debido a la presencia del inductor (ácido oleico) y que hay excreción mientras se tienen recursos energéticos para efectuarla (siempre se queda un cierto nivel de lipasa intracelular cuando se acaba la fuente de carbono).

- Prueba de diferentes estrategias de operación, buscando las más adecuadas para obtener un completo conjunto de experimentos, necesario para poder elaborar el modelo (calibración y validación). De esta manera se han realizado operaciones en discontinuo a diferentes concentraciones de ácido oleico, así como en semicontinuo y continuo.

- Análisis de la actividad proteolítica, no detectándose presencia de proteasas en los medios de cultivo provenientes de diferentes fermentaciones en discontinuo, continuo y semicontinuo.

- Estudio de estabilidad del enzima respecto a factores externos, mostrando una fuerte estabilidad en las condiciones de trabajo utilizadas.

- Observación de la evolución del coeficiente respiratorio. Se puede inducir que se produce un cambio en la actividad metabólica celular que coincide con la excreción de la lipasa intracelular hacia el exterior.

- Determinación de la naturaleza de los pequeños acúmulos o inclusiones observadas en el interior de las células en ciertas etapas de la fermentación, llegándose a conclusión de que se tratan de inclusiones de tipo lipídico.

- La lipasa, en presencia de fase orgánica, en este caso el ácido oleico, se adsorbe en la interfase orgánica-acuosa, disminuyendo la concentración del enzima en la fase acuosa (lipasa detectable). Se han determinado tanto la ley de adsorción como los parámetros de éstos que permitirán predecir la lipasa extracelular en fase acuosa en función de la lipasa extracelular total (f. acuosa + f. orgánica) y la concentración de ácido oleico.

En la figura 4.56 se muestra el esquema global propuesto para la producción de lipasas por *Candida rugosa* utilizando ácido oleico como única fuente de carbono. El sustrato extracelular es transportado hacia el interior de la célula, donde sería consumido para dar más masa celular,

productos y energía, así como transformado en triglicéridos y almacenado. La lipasa es producida en el interior de la célula, e inducida por el ácido oleico extracelular presente en el medio, consumiendo parte del sustrato acumulado. El proceso de síntesis del enzima podría estar modulado por diferentes sistemas de regulación o represión. La lipasa producida es excretada al medio consumiendo igualmente parte del sustrato acumulado (transporte activo), a la vez que se va distribuyendo entre la interfase agua-oleico disponible.

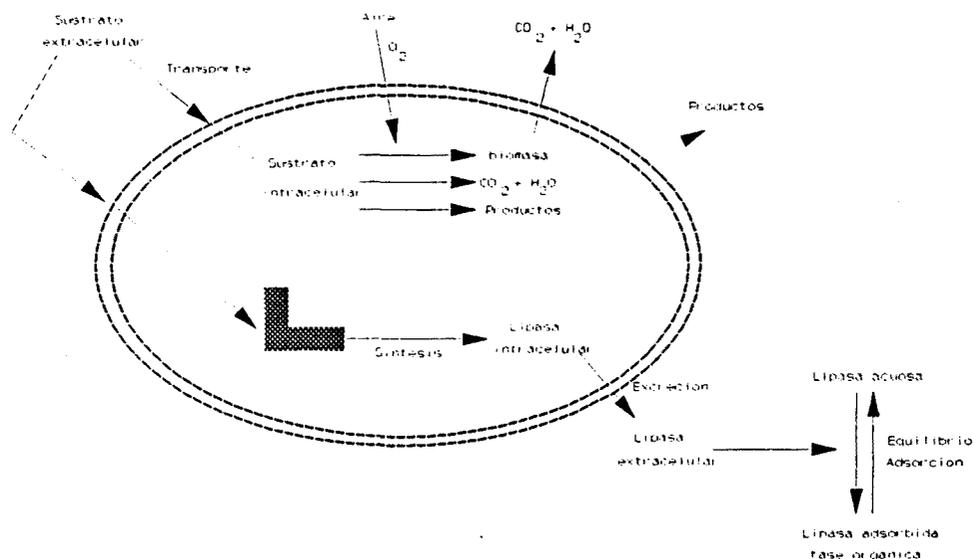


Figura 4.56. Esquema de producción de lipasas por *Candida rugosa*.

#### 4.4.3. Formulación matemática.

Los principales componentes del modelo desarrollado son:

El crecimiento celular es modulado por la concentración intracelular de sustrato, describiéndose por una ecuación de Monod. El ácido oleico es transportado hacia el interior de la célula siguiendo un transporte activo con cinética de saturación, donde es consumido, transformado y almacenado. La producción de lipasas es inducida por el ácido oleico extracelular presente en el medio (usado como única fuente de carbono). Esta lipasa intracelular producida es excretada al medio siguiendo un transporte activo con cinética de saturación, consumiendo parte del sustrato acumulado, a la vez que se distribuye entre la interfase agua-oleico disponible.

Los parámetros del modelo han sido determinados principalmente siguiendo un método secuencial, seguida de una validación para la cual se han utilizado experimentos no incluidos en la etapa de calibración o determinación de los parámetros. Este modelo podrá ser usado para operar en el rango óptimo de concentración de sustrato y para diseñar estrategias de alimentación.

#### 4.4.4. Calibración del modelo.

Para realizar la calibración del modelo, que no es más que encontrar los parámetros del modelo propuesto, se ha escogido un conjunto de experimentos de manera que sea lo más representativo posible de las diferentes situaciones que se puedan producir en el proceso a modelizar. En esta aplicación se utilizan conjuntamente la modelización con la optimización de funciones. Estas funciones serán las denominadas funciones objetivo que habrá que minimizar, en este caso para obtener por ejemplo un residuo mínimo entre valores experimentales y valores predichos por el modelo.

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 sin restricciones se pueden clasificar en dos grandes grupos: los métodos de gradiente y los métodos de búsqueda directa.

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 los 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.

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

Crecimiento celular:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_{ss} + S} \quad [h^{-1}]$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \left[ \frac{g_{\text{biomasa}}}{L_{\text{reactor}} h} \right]$$

Sustrato intracelular:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{k_{S_o} S_o}{K_{S_{oi}} + S_o} - (Y_{SX} \mu + \beta) - \mu S \quad \left[ \frac{g^r_{\text{sustrato intracelular}}}{g_{\text{biomasa seca}} h} \right]$$

Sustrato extracelular:

$$\frac{dS_o}{dt} = - \frac{k_{S_o} S_o}{K_{S_{oi}} + S_o} X \quad \left[ \frac{g^r_{\text{sustrato extracelular}}}{L_{\text{reactor}} h} \right]$$

Lipasa intracelular:

$$\frac{dLip}{dt} = \frac{k_{1m} \frac{S_o}{X}}{K_{1s} + \frac{S_o}{X} + K_i \left( \frac{S_o}{X} \right)^2} \mu - \frac{k_m Lip}{K_s + Lip} \delta S - \mu Lip \quad \left[ \frac{U_{\text{lipasa intracelular}}}{mg_{\text{biomasa}} h} \right]$$

Lipasa extracelular:

$$\frac{dLip_{ext.}}{dt} = \frac{k_m Lip}{K_s + Lip} X \delta S \quad \left[ \frac{U_{\text{lipasa extracelular}}}{mL h} \right]$$

Lipasa acuosa:

$$Lip_{ac} = \frac{Lip_{ext.}}{1 + \frac{K_{11} S_o}{K_{12} + S_o}} \quad \left[ \frac{U_{\text{lipasa acuosa}}}{mL} \right]$$

$$\delta S = \frac{S}{K_{es} + S}$$

En este trabajo los métodos empleados pertenecen al primer grupo donde se utilizan las derivadas, tales como el método del descenso más rápido y el método de Davidon-Fletcher-Powell. Finalmente se ha optado por el método de Davidon-Fletcher-Powell ya que se obtienen mejores resultados en cuanto a resultados y tiempo de cálculo (Himmelblau, 1983).

En todo momento se ha intentado que la búsqueda de parámetros sea una búsqueda global, o sea que una vez seleccionados los experimentos para realizar la calibración del modelo, agrupando a todos los experimentos a la vez. Debido a que son experimentos en que las variables medidas pueden variar considerablemente de rango, habrá que tenerlo en cuenta a la hora de definir la función objetivo. De esta manera las subfunciones para cada experimento y variable tendrán que ser ponderadas por una función peso. Igualmente, no todas las variables interesa que se ajusten con igual bondad o precisión, ya que unas pueden ser más importantes que otras, por lo que tendrán igualmente sus factores de peso específicos.

La función objetivo general para cada experimento es de la forma:

$$f_i = \text{SUM} [ a_i * (X_{\text{exp}} - X_{\text{sim}})^2 + b_i * (\text{Lipa}_{\text{exp}} - \text{Lipa}_{\text{sim}})^2 + c_i * (\text{Lipi}_{\text{exp}} - \text{Lipi}_{\text{sim}})^2 ]$$

evaluada para todos los puntos experimentales. Si se consideran todos los experimentos seleccionados para el proceso de calibración:

$$F = \text{SUM} [ A_i * f_i ]$$

Siendo  $X_{\text{exp}}$  y  $X_{\text{sim}}$  la biomasa experimental y simulada,  $\text{Lipa}_{\text{exp}}$  y  $\text{Lipa}_{\text{sim}}$  la actividad de lipasa extracelular acuosa experimental y simulada, y  $\text{Lipi}_{\text{exp}}$  y  $\text{Lipi}_{\text{sim}}$  la actividad lipásica intracelular experimental y simulada.

Los coeficientes  $a_i$ ,  $b_i$  y  $c_i$  son factores de peso para las diferentes variables con las que se calculan los residuos cuadráticos.  $A_i$  es un factor de peso para cada experimento.

Un paso importante en la optimización es fijar los valores de estos coeficientes de peso, ya que según en que ocasiones, dependiendo de sus valores los parámetros finalmente obtenidos podrían ser un poco diferentes. Se han tomado una serie de consideraciones para ello.

Los factores de peso  $a_i$ ,  $b_i$  y  $c_i$  se han fijado teniendo en cuenta las precisiones relativas de las medidas, el intervalo máximo y el interés del ajuste. De esta manera  $a_i = \alpha_1 / (\text{rangmax } X_{\text{exp}})$ ,  $b_i = \alpha_2 / (\text{rangmax } \text{Lipa}_{\text{exp}})$  y  $c_i = \alpha_3 / (\text{rangmax } \text{Lipi}_{\text{exp}})$ , siendo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  constantes para todos los experimentos ya que se considera la importancia relativa de las variables igual en los experimentos:  $\alpha_1 = 0.35$ ,  $\alpha_2 = 0.45$ ,  $\alpha_3 = 0.20$ .

Los factores de peso  $A_i$ , tan sólo tienen en cuenta el número de puntos experimentales de cada fermentación, para que todas las fermentaciones tengan la misma aportación relativa.

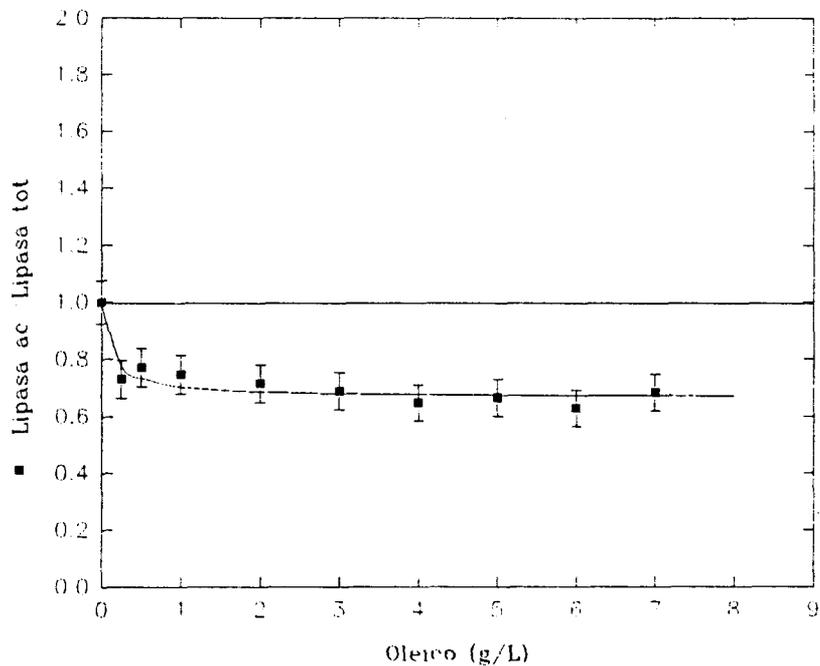
Entonces  $A_i = 1/(N_{\text{puntos}})$ .

De esta forma los parámetros finalmente obtenidos han sido:

$Y_{xs} = 0.86$	Rendimiento biomasa sustrato.
$\beta = 0.$	Coeficiente de mantenimiento fijado arbitrariamente = 0.
$k_{im} = 128.$	Coeficiente de velocidad máxima para la síntesis de lipasa intracelular.
$K_{is} = 0.425$	Coeficiente de saturación para la síntesis de lipasa intracelular.
$K_i = 22.$	Coeficiente de inhibición para la síntesis de lipasa intracelular.
$k_m = 0.55$	Velocidad máxima de transporte de lipasa extracelular.
$K_s = 0.25$	Constante de saturación en el transporte de lipasa extracelular.
$k_{so} = 0.15$	Velocidad máxima de transporte de sustrato.
$K_{so1} = 0.25$	Constante de saturación en el transporte de sustrato.
$\mu_{\max} = 0.25$	Velocidad específica máxima de crecimiento referido al sustrato intracelular.
$K_{ss} = 0.05$	Constante de saturación en el crecimiento referido al sustrato intracelular.
$k_{11} = 0.50$	Constante de adsorción máxima de la lipasa extracelular en fase acuosa/orgánica.
$K_{12} = 0.19$	Constante de saturación de la adsorción de la lipasa extracelular en fase acuosa/orgánica.
$S^*c = 0.75$	Concentración mínima de sustrato que ha de ser consumida, para que una vez alcanzados los niveles necesarios de ciertos metabolitos, se proceda a la síntesis de lipasa intracelular.
$K_{ca} = 10^{-7}$	Constante de saturación determinante de la existencia de recursos energéticos para realizar la excreción de la lipasa intracelular.

De todos estos parámetros, los correspondientes a la ley de adsorción ha sido determinado por experimentos preliminares, en los cuales a partir de diferentes concentraciones de lipasa, se iban adicionándose diferentes cantidades de ácido oleico (fase orgánica) al medio de cultivo (fase acuosa) en las condiciones de operación del fermentador. De esta manera se obtenía una curva de adsorción de la lipasa en las fases orgánico/acuosa. Se ha utilizado la expresión de adsorción con saturación, ya que se ha considerado la más apropiada para este caso (Borgström, 1983). En la figura 4.57 se muestran los resultados observándose un buen ajuste.

Los resultados de esta etapa de calibración se pueden observar en la figura 4.58 (Gordillo, 1993).



**Figura 4.57.** Variación de la actividad lipolítica en la fase acuosa en función de la concentración de la fase orgánica.

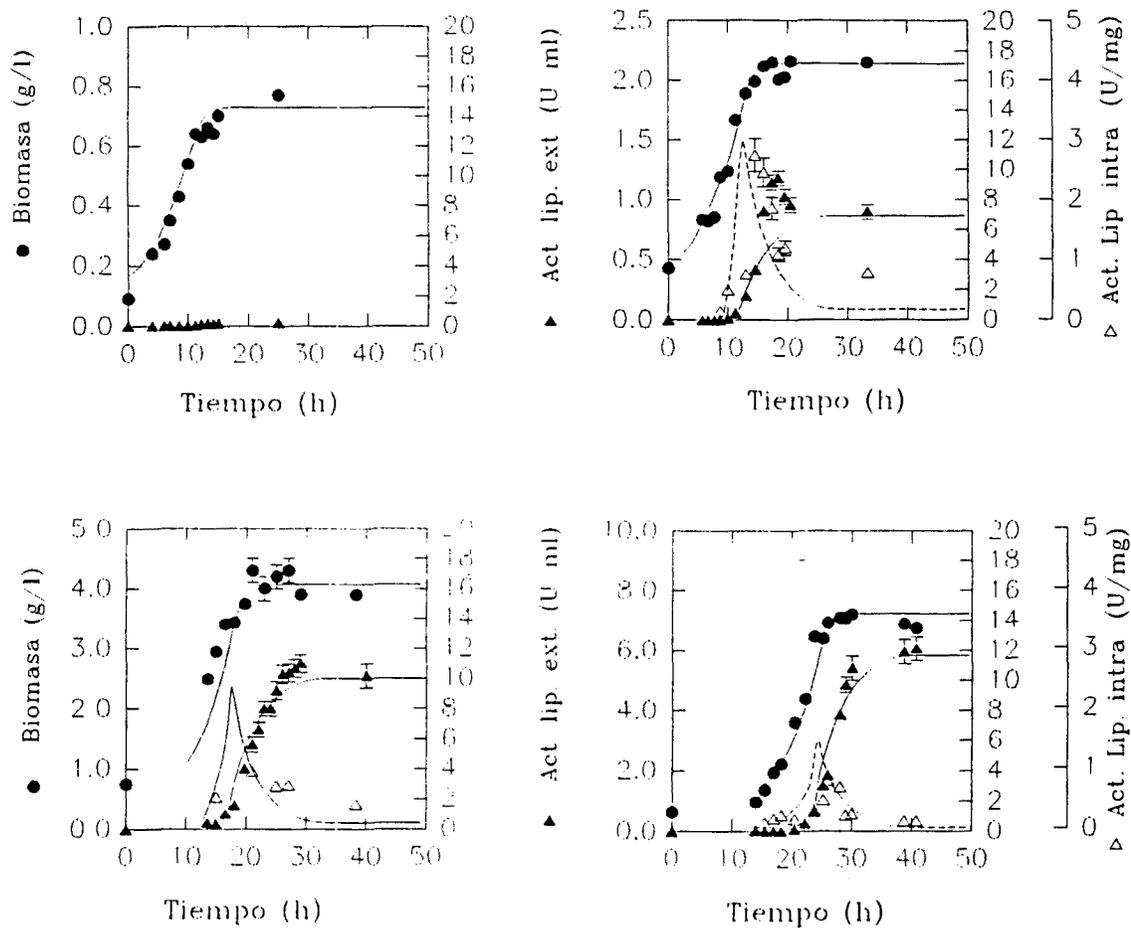


Figura 4.58. Resultados de la etapa de calibración del modelo para la producción de lipasas por *Candida rugosa*.

## **5.- CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

- 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 comportamiento de la lipasa intracelular y extracelular en diferentes condiciones de operación y velocidad específica de crecimiento, sugieren que si bien a velocidades de crecimiento lenta el proceso de síntesis podría ser el paso limitante en la producción, cuando se incrementa la velocidad de crecimiento (c. continuo) la fase de excreción pasaría a ejercer un peso importante hasta llegar a ser incluso el paso limitante.
- Se ha estudiado el efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de lipasas. 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.
- 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.
- Han sido resueltos los problemas de aplicación de un espectrómetro de masas (Spectramass PC2000) a procesos de fermentación debido a dificultades de comunicación y software. Se ha diseñado e implementado un sistema de análisis multicanal, con adquisición de datos y estimación, mediante la construcción de un software específico desarrollado en C++.

- 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.
  
- La selección del medio de cultivo y un 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.
  
- La optimización de la producción de lipasas por *Candida rugosa* debería implicar el control de la concentración de ácido oleico en el medio, Entonces la estrategia de operación más adecuada sería un cultivo en semicontinuo de forma controlada.

## **6.- NOMENCLATURA**

## 6. NOMENCLATURA

- 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 ( $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ )  
 $v_{lp}$  - Velocidad de hidrólisis de aceite de oliva  
 $\mu_{gly}$  - Velocidad de consumo de glicerol por unidad de biomasa  
 $\mu_{fa}$  - Velocidad de consumo de ácidos grasos por unidad de biomasa  
 $\mu_{lp}$  - Velocidad de producción de lipasas por unidad de biomasa  
 $Y_{ca}$  - Rendimiento biomasa seca/ácidos grasos ( $\text{g}/\text{g}$ )  
 $Y_{cg}$  - Rendimiento biomasa seca/glicerol ( $\text{g}/\text{g}$ )  
 $Y_{la}$  - Rendimiento lipasa/ácidos grasos ( $(\text{U}/\text{ml})/(\text{g}/\text{l})$ )  
 $k_1$  - Velocidad específica de crecimiento sobre ácidos grasos  
 $K_c$  - Constante de saturación  
 $K_i$  - Constante de inhibición para la lipasa  
 $k_{11}$  - velocidad específica de crecimiento sobre glicerol  
 $K_3$  - Constante de hidrólisis del aceite de oliva

S: substrato ( $\text{g}/\text{L}$ )

$X_o$ : biomasa inicial ( $\text{g}/\text{L}$ )

$X_f$ : biomasa final ( $\text{g}/\text{L}$ )

$P_f$ : lipasa final ( $\text{U}/\text{mL}$ )

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

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

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

$Y_{xs}$  Rendimiento biomasa sustrato.

$\beta$  Coeficiente de mantenimiento fijado arbitrariamente = 0.

$k_{im}$  Coeficiente de velocidad máxima para la síntesis de lipasa intracelular.

- $K_{1s}$  Coeficiente de saturación para la síntesis de lipasa intracelular.
- $K_i$  Coeficiente de inhibición para la síntesis de lipasa intracelular.
- $k_m$  Velocidad máxima de transporte de lipasa extracelular.
- $K_s$  Constante de saturación en el transporte de lipasa extracelular.
- $k_{so}$  Velocidad máxima de transporte de sustrato.
- $K_{so1}$  Constante de saturación en el transporte de sustrato.
- $\mu_{max}$  Velocidad específica máxima de crecimiento referido al sustrato intracelular.
- $K_{ss}$  Constante de saturación en el crecimiento referido al sustrato intracelular.
- $k_{11}$  Constante de adsorción máxima de la lipasa extracelular en fase acuosa/orgánica.
- $K_{12}$  Constante de saturación de la adsorción de la lipasa extracelular en fase acuosa/orgánica.
- $S^*c$  Concentración mínima de sustrato que ha de ser consumida, para que una vez alcanzados los niveles necesarios de ciertos metabolitos, se proceda a la síntesis de lipasa intracelular.
- $K_{cs}$  Constante de saturación determinante de la existencia de recursos energéticos para realizar la excreción de la lipasa intracelular.

## **7.- BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aisaka, K. and Tarada, O., Purification and properties of lipoprotein lipase from *Rhizopus japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 799-805, (1980).
- Ajima, A., Yoshimoto, T., Takahashi, K., Tamaura, Y., Saito, Y. and Inada, Y., Polymerization of 10-hydroxydecanoic acid in benzene with polyethylene glycol-modified lipase. *Biotechnology Letters*, 7, 5, 303-306, (1985).
- Aston, W.J. and Turner, A.P.F., Biosensors and biofuel cells, en *Biotechnology and genetic engineering reviews*, Rusell, G.E. (Ed.), 1, 89-120, (1984).
- Barnett, J.A., *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Tipson, R.S. and Horton, D., (Eds.), 32, 125-234, Academic Press, New York, (1976).
- Bastin, G., and Dochain D., *On line Estimation and Adaptative Control of Bioreactors*, Elsevier Ed., Amsterdam, (1990).
- Beck, M. B., and Young, P.C., An introduction to system identification, parameter and state estimation, en *Computer applications in fermentation technology: Modelling and control of biotechnological processes*, Fish, N.M., Fox, R.I. and Thornhill, N.F. (Eds.), ICCAFT4, Elsevier, Amsterdam, (1989).
- Bellgardt, K.H., Kuhlman, W., Meyer, H.D., Schügerl, K. and Thoms, M., Application of an extended Kalman Filter for state estimation of a yeast fermentation, *IEEE Proceedings*, 133, parte D, 5, (1986).
- Benzonana, G. and Expósito, S., On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 231, 15-22, (1971).
- Björkling, F., Godtfredsen, S. E. and Kirk, O., The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnology*, 9, 360-363, (1991).
- Borgström, B. and Brockman, H. (Eds.), *Lipases*, Elsevier Ed., Amsterdam, (1984).
- Brockerhoff, H. and Jensen, R. G., Lipolytic enzymes, in *Lipases*, 25-175. Academic Press Ed., New York, (1974).
- Bucolo, G. and David, H., Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes, *Clinical Chemistry*, 19, 476-482, (1973).
- Chander, H. and Klostermeyer, H., Production of lipase by *Geotrichum candidum* under various growth conditions. *Milchwissenschaft*, 38, 7, 410-412, (1983).
- Charton, E., Davies C. and Macrae, A.R., Use of specific polyclonal antibodies to detect heterogeneous lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochemical et Biophysca Acta*, 1127, 191-198, (1992).

- Chattaway, T., Demain A.L. and Stephanopoulos G., Use of various measurements for biomass estimation, *Biotechnology Progress*, 8, 81-84, (1992).
- Coleman, M.H., The structural investigation of natural fats, in *Advances in Lipid research*, 1, 1-64, (1963).
- Cooney, C.L., Koplove, H.M. and Häggström, M., Transient phenomena in continuous culture, en *Continuous Culture of Cells*, Calcott, P.H. (Ed.) , 2, 143-168, CRC Press, Boca Raton, (1981).
- Coppella, S. J., and Dhurjati, P., Low-cost computer-coupled fermentor off-gas analysis via quadrupole Mass Spectrometer. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 679-689, (1987).
- De Caro, J. and Boudonart, M., Porcine pancreatic lipase: completion of the primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 671, 129-138, (1981).
- del Castillo, L. and Herrero, E., Aspectos genéticos de levaduras, en *Revisiones sobre Biología Celular*, 4, Universidad del País Vasco (Ed.), (1985).
- del Rfo, J.L., Serra, P., Valero, F., Poch, M. and Solà, C., Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil, *Biotechnology Letters*, 12, 11, 835-838, (1990).
- del Rfo Pericacho, J.L., Estudios sobre el proceso de producción de lipasas por *Candida Rugosa*, *Tesis doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, (1991).
- Falk, M.P.F., Sanders, E.A. and Deckwer, W.D., Studies on the production of lipase from recombinant *Staphylococcus carnosus*, *Applied Microbiology Biotechnology*, 35, 10-13, (1991).
- Ferrer, P. and Solà, C., Lipase production by immobilized *Candida rugosa* cells, *Applied Microbiology Biotechnology*, 37, 737-741, (1992).
- Flaus, J.M. and Cheruy, A., Estimation of the state and parameters of a bioprocess using the Recursive Prediction Error Method. *Proceedings of IFAC Symposium Advanced Information Processing in Automatic Control*, Nancy, (1989).
- Flaus, J.M., Cheruy, A., Engasser, M., Poch, M. and Solà, C., Estimation of the state and parameters in bioprocesses from indirect measurements. *Proceedings of the First European Control Conference*, Grenoble, 1642, (1990).
- Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W., Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa-EF2*. *Journal of Genetical Microbiology*, 137, 2215-2221, (1991).
- Gillies, B., Yamazaki, H. and Armstrong, D.W., Production of flavour esters by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, 9, 10, 709-714, (1987).
- Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Van Cauwenbergh, J.L. and Tobback, P.P., Lipase catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 258-266, (1987).

- Hadeball, W., Production of lipase by *Yarrowia lipolytica* I. Lipases from yeasts. *Acta Biotechnologica*, 11, 2, 159-167, (1991).
- Harder, A., Roels, J.A., *Advanced Biochemical Engineering*, 21, 55, (1982).
- Hayward, M. J., D.E. Rieden, T. Kotiaho, R.G. Cooks, G.D. Austin, M.J. Syu and G.T. Tsao. Bioreactor monitoring using flow injection/membrane introduction mass spectrometry with an ion trap detector, *Process Control and Quality*, 1, 2, 105, (1991).
- Heinzle, E., Framer H. and Dunn, I.J., State analysis of fermentation using a Mass Spectrometer with membrane probe, *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 238-246, (1985).
- Heinzle, E., Mass Spectrometry for on-line monitoring of biotechnological processes, en *Advanced in Biochemical Engineering and Biotechnology*, Fiechter A. (Ed.), 37, 1-, Springer-Verlag Ed., Berlin, (1987).
- Heinzle, E. and Reuss, M., *Mass Spectrometry in Biotechnological Process Analysis and Control*, Plenum Ed., New York. (1987).
- Hegedus, D. and Khachatourians, G., Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*, *Biotechnology Letters*, 10, 9, 637-642, (1988).
- Henson, M. A., and Seborg D.E., An internal model control strategy for nonlinear systems. *AIChE Journal*, 37, 1065, (1991).
- Himmelblau, D.M. and Bischoff, K.B., *Análisis y simulación de procesos*, Reverté Ed., Barcelona, (1976).
- Hoq, M.M., Yamane, T., Shimizu, S., Funada, T. and Ishida, S. Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane bioreactor. *Journal of American Oil Chemical Society*, 61, 4, 776-781, (1984).
- Hoq, M.M., Koike, M., Yamane, T. and Shimizu, S., Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic hollow fiber bioreactor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 11, 3171-3178, (1985).
- Iwai, M., Okumura, S. and Tsujisaka, Y., The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium*, *Westring. Agricultural and Biological chemistry*, 39, 1063-1070, (1975).
- Jacob, F., Monod, J., Regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, *Journal of Molecular Biology*, 3, 318, (1961).
- Jacobsen, T., Olsen, J., Allerman, K., Poulsen, O.M. and Har, J., *Enzyme Microbial Technology*, 11, 90-95, (1989).
- Jazwinski, A.H., *Stochastic Processes and Filtering Theory*, Academic Press Ed., New York, (1970).
- Jensen, R.G., Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*, a review, *Lipids*, 9, 143-157, (1974).

- Jensen R.G., and Pitas R.E., Specificity of the lipase from *Geotrichum candidum*, en *Lipids*, Paleotti (Ed.), 141-146, Raven press Ed., New York, (1976).
- Jensen R.G., Dejong, F.A. and Clark, R.N., Determination of lipase specificity, *Lipids*, 18, 239-252, (1983).
- Kalman, R.E., and Bucy, R.S., New results in linear filtering and prediction theory, *Journal of Basic Engineering*, Trans. ASME Series D, 83, 3, 95-108, (1961).
- Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A. and Fukui, S., *European Journal of Biochemistry*, 83, 609-, (1978).
- Karim, N., On-line estimation of bioreactors using recurrent neural networks. *Proceedings of the ICCAFTS5/IFAC-BIO2 Symposium*, Keystone, (1992).
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. and Iwasaki, S., *Nature*, 341, 164-166, (1989).
- Kiss, D.R. and Staphanopoulos, G., Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch cultures, *Biotechnology Progress*, 7, 501-509, (1991).
- Konstantinov, K. and Yoshida, T., Knowledge-based control of fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 39, 479, (1992).
- Lechner, M., Märkl, H. and Götz, F., Lipase production of *Staphylococcus carnosus* in a dialysis fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 345-349, (1988).
- Lee, Y.K. and Choo, Ch.L., The Kinetics and Mechanism of Shear Inactivation of Lipase from *Candida cylindracea*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 183-190, (1988).
- Lewin, B., *Genes*, John Wiley & Sons Ed., New York, (1983).
- Linfield, W.M., O'Brien, D.J., Serota, D. and Baraustas, R.A., Lipid-lipase interaction fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. *Journal of American Oil Chemical Society*, 61, 6, (1984).
- Liu, W.H., Beppu, T. and Arima, K., Substrate specificity and mode of action of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa-S38*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 1349-1355, (1973).
- Ljung, L. and Soderström, T., *Theory and Practice of Recursive Identification*, MIT Press, Cambridge, (1983).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275., (1951).
- Luyben, K.Ch.A.M., Engineering aspects of Biochemical Engineering. *Fifth European Congress on Biotechnology*, Copenhagen, (1990).
- Macrae, A. R. and Hammond, R.C., Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 193-217, (1985).

- Macrae, A.R., Extracellular microbial lipases, en *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Fogarty, W.M., (Ed.), 225-250. Applied Science Publishers, London, (1983).
- Marlot, C., Langrand G., Triantaphylides, C. and Baratti, G., Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports, *Biotechnology Letters*, 7, **9**, 647-650, (1985).
- MATLAB, Filter design, en *Signal Processing Toolbox. User's guide*, The MathWorks, (1988).
- Matos, J.R., West, J.B., Wong, C.H., Lipase catalysed synthesis of peptides: Preparation of a Penicillin G precursor and other peptides. *Biotechnology Letters*, 9, **4**, 233-236, (1987).
- Matsushima, A., Kosera, Y., Takahashi, K., Saito, Y. and Inada, Y., Ester-exchange reaction between triglycerides with polyethylene glycol-modified lipase. *Biotechnology Letters*, 8, **2**, 73-78, (1986).
- Megraw, R.E., Dunn, D.E. and Biggs, H.G., Manual and continuous flow colorimetry of triacylglycerols by a fully automatic method, *Clinical Chemistry*, 25, 273-278, (1979).
- Miles, R.J., Siu, E.L.T., Carrington, C., Richardson, A.C., Smith, B.V. and Price, R.G., The detection of lipase activity in bacteria using novel chromogenic substrates. *FEMS Microbiology Letters*, 90, 283-288, (1992).
- Monod, J., *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann, eds., París, (1942).
- Montesinos, J.L., Campmajó, C., Iza, J., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C., Software development to fermentation gas analysis using mass spectrometry. *Biotechnology Techniques*, 7, **7**, 501-506, (1993).
- Montesinos, J.L., Campmajó, C., Iza, J., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C., Use of an intelligent system to monitor and control fermentation processes: Application to lipase production by *Candida rugosa*. *Process Control and Quality*, en prensa, (1993).
- Moskowitz, G.J., Cassaique, R., West, I.R., Shen, T. and Feldman, L.I., Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with *Mucor miehei* esterase. Properties of the enzyme. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 25, 1146-1150, (1977).
- Nair, S.C. and Bone, H., Production of lipases of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor, *Biotechnology Letters*, 9, **8**, 601-604, (1987).
- Narasaki, T., Tamura, G. and Arima, K., Studies on the lipoprotein lipases of microorganisms part II. Effects of culture conditions on the production of lipoprotein lipases by *Pseudomonas sp. M-12-33*, *Agricultural Biological Chemistry*, 32, **12**, 1453-1457, (1968).
- Nishio, T., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Koderá, Y., Saito, Y. and Inada, Y., Terpene alcohol ester synthesis by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biotechnology Letters*, 9, **3**, 187-190, (1987).
- Novotny, C., Dolezalova, L., Musil, P. and Novak, M., The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 28, 221-227, (1988).

- Obradors, N., Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C., Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters*, 15, 4, 357-360, (1993).
- Okeke, C. N. and Okolo, B.N., The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. *Biotechnology Letters*, 12, 10, 747-750, (1990)
- Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y., Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 655-660, (1980).
- Ota, Y., Nakamiya, T. and Yamada, K., On the substrate specificity of the lipase produced by *Candida parapolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 1895-1898, (1972).
- Ota, Y., Miyairi, S. and Yamada, K., Sterol requirement for the lipase production by *Candida rugosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 12, 1476-1478, (1968).
- Ota, Y., Suzuki, M. and Yamada, K., Lipids and Related Substances Inducing the Lipase Production by *Candida parapolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 3, 390-391, (1968).
- Pal, N., Das, S. and Kundu, A.K., Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation Technology*, 56, 6, 593-598, (1978).
- Parks, T.W., Burrus, C.S., *Digital Filter Design*, John Wiley & Sons Ed., New York, (1987).
- Perry, R.H. and Chilton, C.H., *Chemical Engineer's Handbook*, McGraw-Hill, Kogakusha, (1973).
- Posorske, L.H., *Journal of American Oil Chemical Society*, 61, 1758-1760, (1984).
- Rattray, B.M.J., Biotechnology and the fats and oils industry -an overview. *Journal of American Oil Chemical Society*, 61, 11, 1701-1710, (1984).
- Ratledge, C., Evans, C.T., *Lipids and their metabolism*, en *The Yeast* (Rose, A.H. and Harrison, J.S., Eds.), 3, 10, 372-385, Academic Press, New York, (1989).
- Rose, A.H., and Harrison J.S., *The yeast vol. 3*, Academic Press, New York, (1989).
- Royce, P.N. and Thornill, N.F., Analysis of noise and bias in fermentation Oxygen Uptake Rate data. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 634-637, (1992).
- Royce, P.N., Effect of changes in the pH and Carbon Dioxide Evolution Rate on measured respiratory quotient of fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1129-1138, (1992).
- Santa Maria, J. and Sánchez, C., *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas*, 5, 63, Madrid, (1977).
- Scheuning, W.D. and Fritz, H., Sperm acrosin, en *Methods in enzymology*, 45, 330-342. Academic Press, New York, (1976).
- Schrag, J.D., Li, Y., Wu, S. and Cygler, M., Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, 351, 761-764, (1991).

- Schügerl, K., Lübbert, A. and Scheper, T., Online process analysis in bioreactors. *International Chemical Engineering*, 30, 433, (1990).
- Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T. and Inamasu, S., Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *Journal of American Oil Chemical Society*, 61, 11, 1761-1765, (1984).
- Semeriva, M., Benzonana, G., and Desnuelle, P., Some properties of a lipase from *Rhizopus arrhizus*, separation of a glycopeptide bound to the enzyme. *Biochemical et Biophysica Acta*, 191, 598-610, (1969).
- Serra, P., del Rfo, J.L., Robusté, J., Poch, M., Solà, C. and Cheruy, A., A model for lipase production by *Candida rugosa*. *Bioprocess Engineering*, 8, 145-150, (1992).
- Shaw, J. and Klibanov A.M., Preparation of various glucose esters via lipase-catalyzed hydrolysis of glucose pentaacetate. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 648-651, (1987).
- Sidebottom, C.M., Charton, E., Dunn, P.P.J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J.L., Macrae, A.R. and Slabas, A.R., *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *European Journal of Biochemistry*, 202, 485-491, (1991).
- Stephanopoulos, G. and San, K.Y., Studies on On line Bioreactor Identification. (part I-II), *Biotechnology and Bioengineering*, 26, 1176, (1984).
- Sugiura, M. and Isobe, M., Effects of temperature and state of substrate on the rate of hydrolysis of glycerides by lipase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 681-682, (1975a).
- Sugiura, M. and Isobe, M., Studies on the lipase of *Chromobacterium viscosum*. IV. Substrate specificity of a low molecular weight lipase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 23, 1226-1230, (1975b).
- Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T. and Shimizu, S., Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 417-422, (1988).
- Sztajer, H. and Zboinska, E., Microbial lipases in Biotechnology. *Acta Biotechnology*, 8, 2, 169-175, (1988).
- Thibault, J., Van Breusegem, V. and Cheruy, A. On-line prediction of fermentation variables using neural networks. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 1041, (1992).
- Tsujiisaka, Y., Iwai, M., Fukumoto, J. and Okamoto, Y., Induced formation of lipase by *Geotrichum Candidum* link. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 837-842, (1973).
- Vadehra, D.V., Staphylococcal lipases, *Lipids*, 9, 158-165, (1974).
- Valero, F., Ayats, F., López-Santfín, J. and Poch, M., Lipase production by *Candida rugosa*: fermentation behaviour. *Biotechnology Letters*, 10, 10, 741-744, (1988).

- Valero, F., Lafuente, J., Poch, M., Solà, C., Araujo, A.N. and Lima, J.L., On-line fermentation monitoring using flow injection analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 647, (1990a).
- Valero, F., Lafuente, J., Poch, M. and Solà, C., Biomass estimation using on line monitoring by FIA: application to *Candida Rugosa* batch growth. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 24/25, 591, (1990b).
- Valero Barranco, Francisco, Estudio de la producción de lipasas por *Candida rugosa*, *Tesis doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, (1990c).
- Valero, F., del Rfo, J.L., Poch, M. and Solà, C., Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 72, 5, 399-401, (1991a).
- Valero, F., Poch, M., Solà, C., Santos Lapa, R.A. and Lima, J.L., On-line monitoring of lipase production in fermentation processes. *Biotechnology Techniques*, 5, 251, (1991b).
- Valero, F., del Rfo, J.L., Poch, M. and Solà, C., Studies on lipase production by *Candida rugosa* using on-line enzymatic analysis. *Biochemical Engineering VII. Annals New York Academic Science*. 665, 334-344, (1992).
- Vermeire, A., Pille, S., Himpe, J. and Vandamme, E., Screening and production of microbial lipases, *Med. Fac. Landbouw Rijksuniv. Gent.*, 52, 4, 1853-1861, (1987).
- Vorderwülbecke, K.K. and Erdmann, H., Comparison of lipases by different assays, *Enzyme Microbiology Technology*, 14, 631-639, (1992).
- Wang, Y.J., Sheu, J.Y., Wang, F.F. and Shaw, J.F., Lipase-catalyzed oil hidrolys in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 628-633, (1988).
- Winkler, F.K., D'Arcy, A. and Hunziker, W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343, 771-774, (1990).
- Wisdom, R.A., Dunnill, P. and Lilly, M.D., Enzymic interesterification of fats: the effect of non-lipase material on immobilized enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 567-572, (1985).

## **8.- APENDICE**

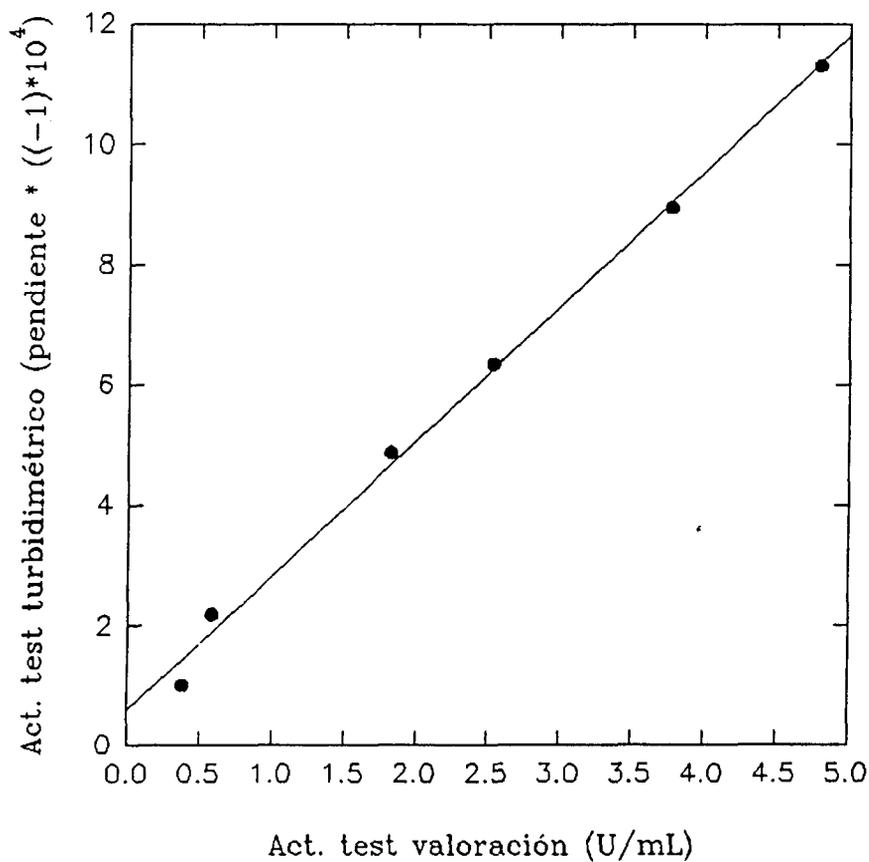
### 8.1. Curva de calibración entre los test de análisis de lipasas.

En la figura 8.1 se presenta la calibración entre las pendientes obtenidas a partir del test turbidimétrico y las unidades de actividad lipolítica por mililitro de enzima, calculadas a partir del test de valoración.

La regresión lineal de la recta produce la siguiente ecuación:

$$\text{pendiente t. turbid.} \cdot (-10^4) = 2.24 \cdot \text{Act. lipolítica (U/mL)} + 0.59$$

$$\text{coeficiente de correlación} = 0.9979$$



*Figura 8.1. Curva de calibración entre los test de análisis de lipasas.*

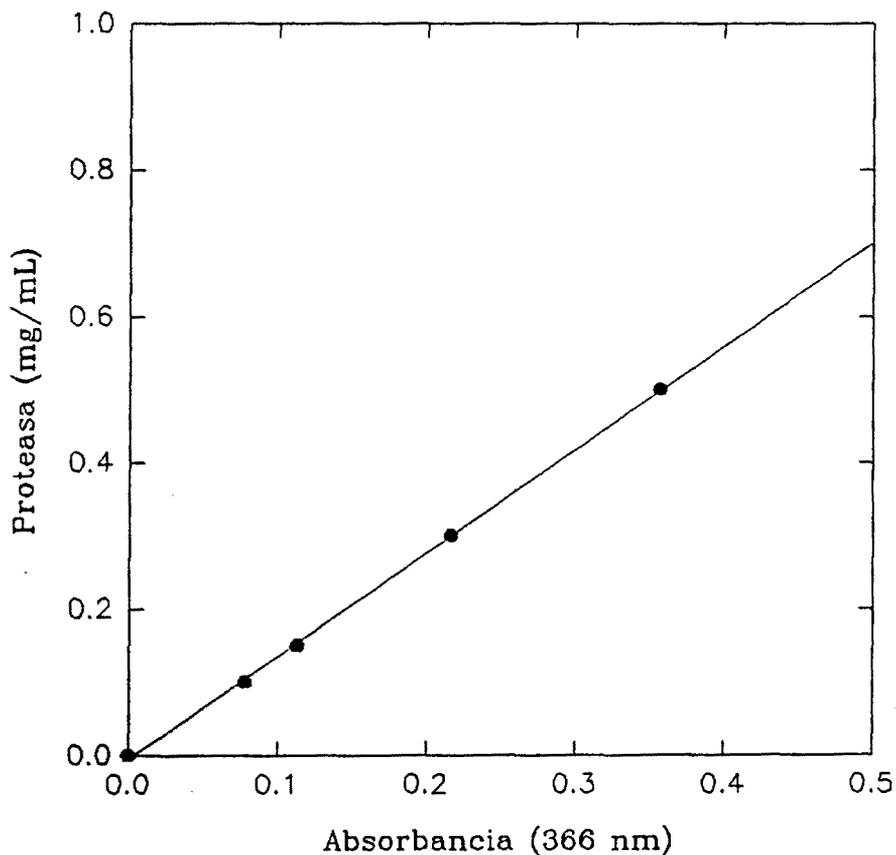
### 8.2. Curva de calibración del análisis de proteasas.

Los resultados obtenidos para la curva de calibración de proteasas, utilizando papaina se encuentran representados en la gráfica 8.2.

La regresión lineal de la recta presenta como ecuación:

$$\text{mg proteasa/mL} = -0.0057 + 1.4119 * \text{ABS}(366 \text{ nm})$$

$$\text{coeficiente de correlación} = 0.9981$$



*Figura 8.2. Curva de calibración de proteasas.*

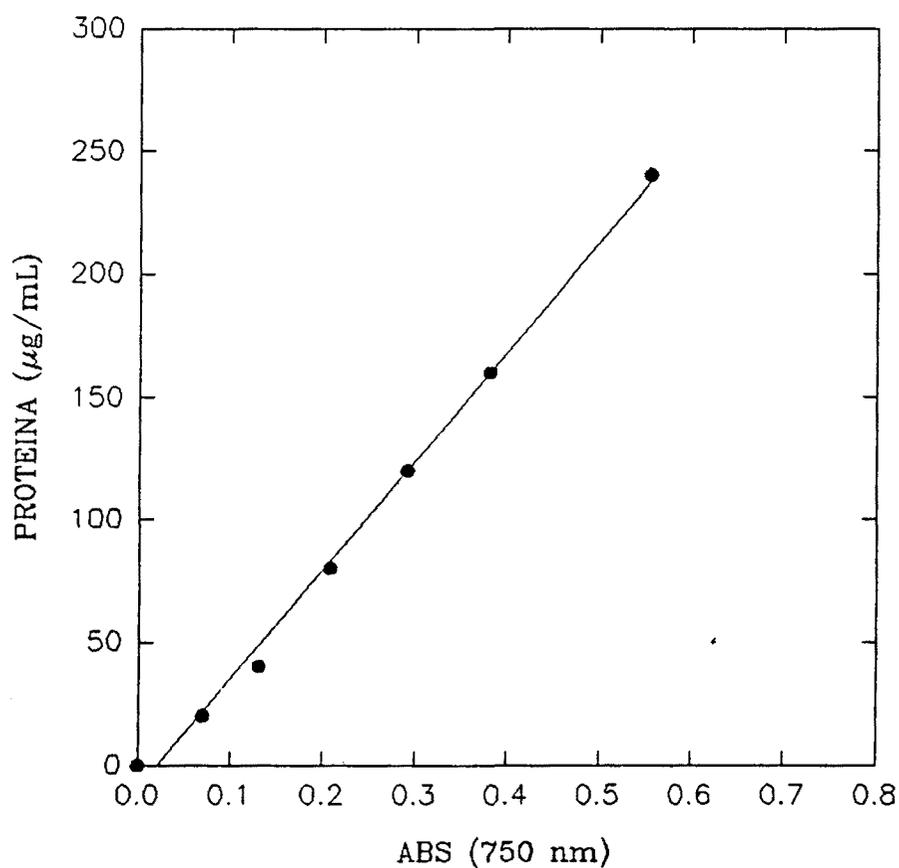
### 8.3. Curva de calibración de proteína.

Los resultados obtenidos para la realización de una curva de calibración de proteína utilizando suero bovino, se encuentran representados en la gráfica 8.3.

La regresión lineal de la recta presenta la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g proteína/mL} = -9.449 + 444.1 * \text{ABS (750 nm)}$$

coeficiente de correlación = 0.9980



*Figura 8.3. Curva de calibración de proteína.*

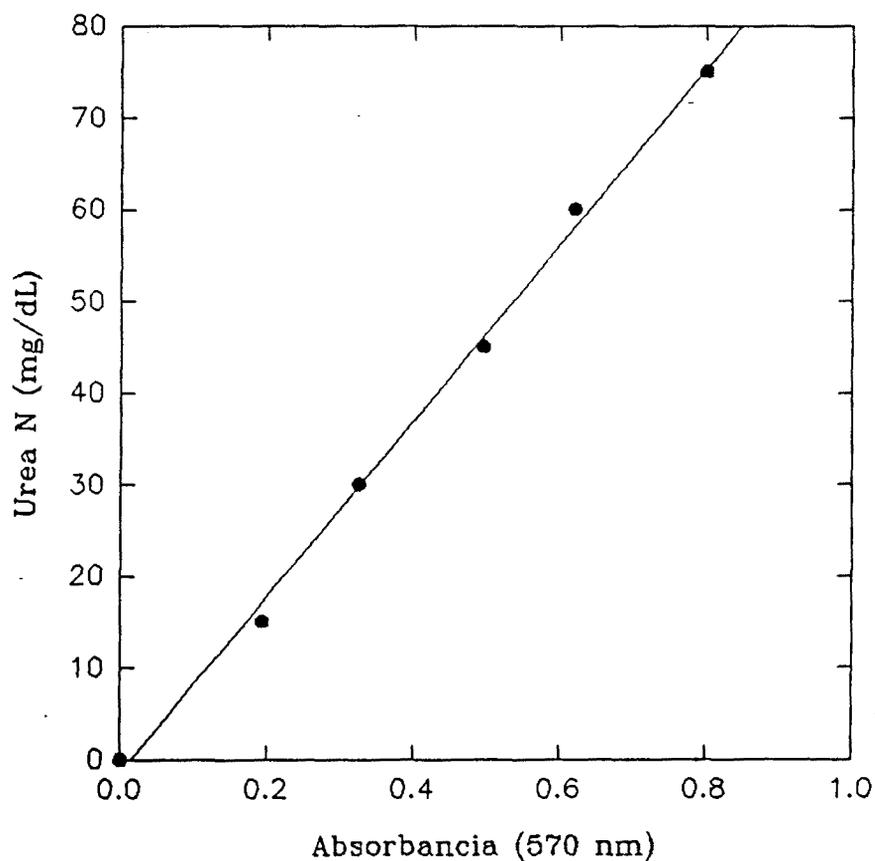
#### 8.4. Curva de calibrado de Urea.

Los resultados obtenidos para la realización de la curva de calibración de urea se encuentran representados en la gráfica 8.4.

La regresión lineal de la recta presenta como ecuación:

$$\text{mg urea/dL} = -1.441 - 96.03 * \text{ABS}(570 \text{ nm})$$

$$\text{coeficiente de correlación} = 0.9985$$



*Figura 8.4. Curva de calibrado del análisis de urea.*

### 8.5. Curva de calibrado de nitrógeno amoniacal.

Los resultados obtenidos para la curva de calibración del nitrógeno amoniacal se encuentran representados en la gráfica 8.5.

La regresión lineal de la recta presenta como ecuación:

$$\log [\text{ppm N-NH}_4^+] = -1.401 - 0.0174 * \text{mV}$$

$$\text{coeficiente de correlación} = 0.9997$$

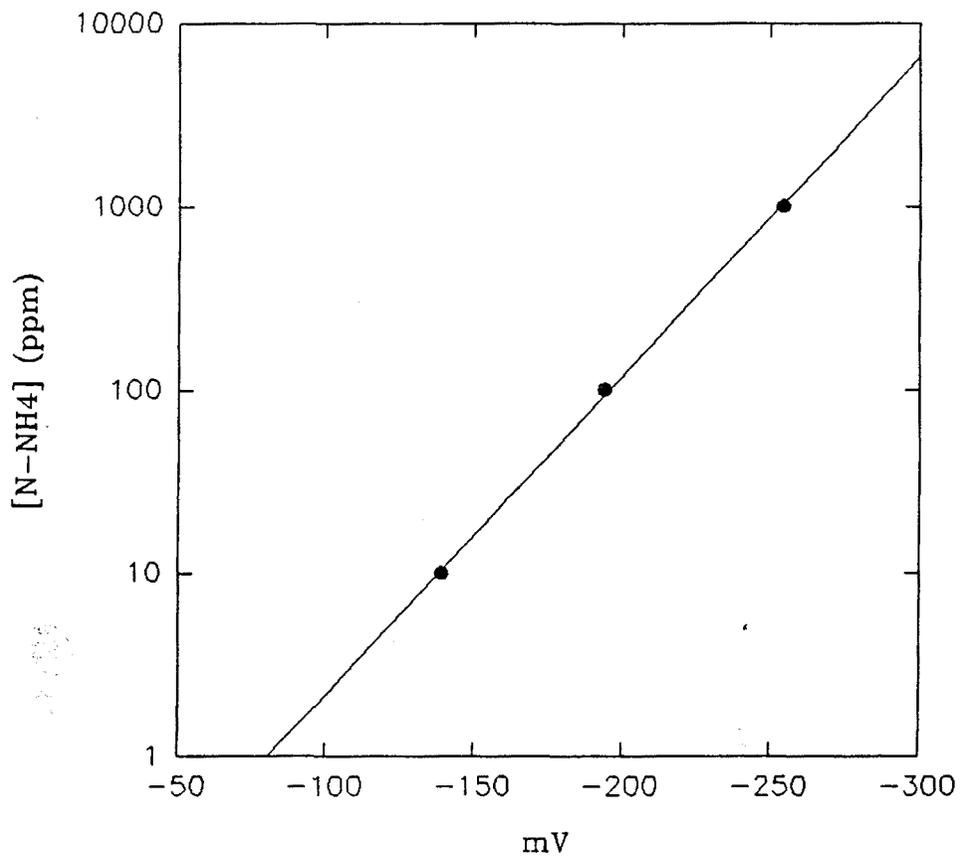


Figura 8.5. Curva de calibrado de  $\text{N-NH}_4^+$ .

### 8.7. Curva de calibrado de ácidos grasos.

Se realizan curvas de calibrado de ácidos grasos, utilizando ácido hexanoico y heptanoico (patrón interno) en concentraciones conocidas y seguidamente se analizan. De los resultados de estos análisis se obtienen las relaciones entre las áreas de los picos representativos.

Los resultados de este calibrado se presentan en la figura 8.7. La recta de calibrado obtenida válida para todos los ácidos grasos excepto el C<sub>4</sub> es:

$$\text{masa } C_n / \text{masa } C_7 = 0.021 + 1.11 * (\text{area } C_n / \text{area } C_7)$$

$$\text{Coeficiente de correlación} = 0.999$$

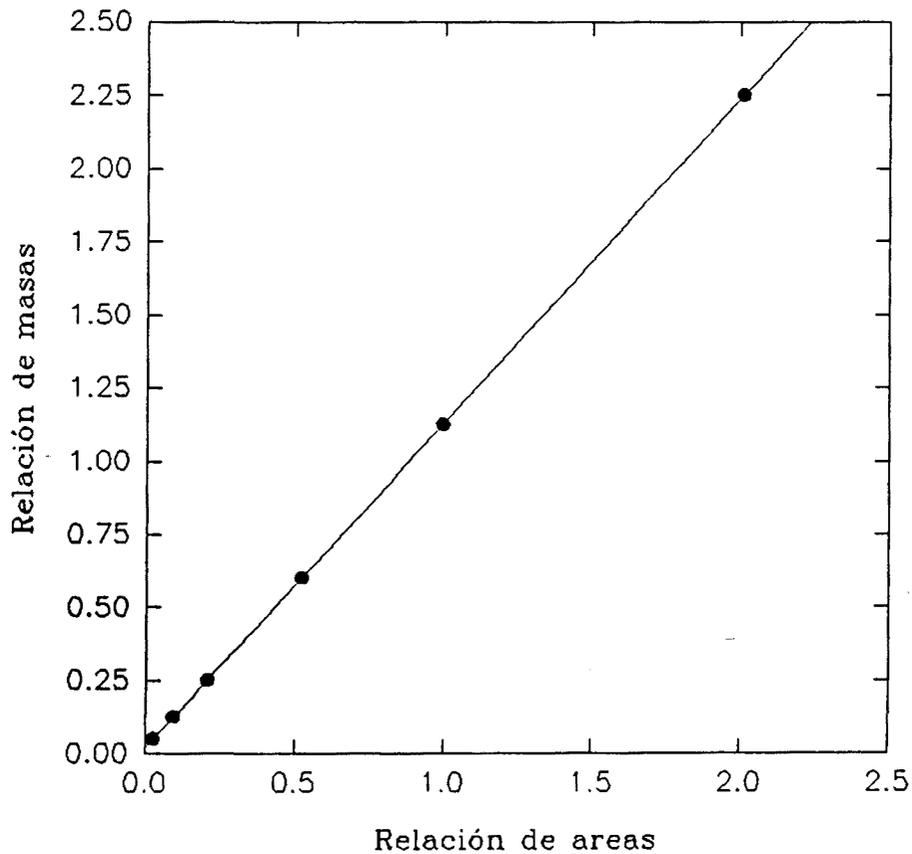


Figura 8.7. Curva de calibrado de ácidos grasos de cadena corta.

FIG4-1.SPG

FIGURA A			FIGURA B		
Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.10	0.00	0.00	0.07	0.00
13.00	0.19	0.00	14.30	1.00	--
17.40	0.50	0.96	17.30	1.82	--
23.30	--	0.95	18.70	1.62	--
25.90	1.86	2.45	21.20	2.48	--
27.90	2.32	--	23.20	2.80	--
30.40	3.10	--	25.00	4.70	0.30
32.90	3.83	6.29	32.00	6.30	1.35
35.80	4.47	7.36	37.00	6.40	4.16
37.80	4.83	8.32	41.00	6.20	4.48
40.20	5.13	--	43.50	6.10	4.40
42.20	5.50	12.90	46.00	6.24	4.34
49.00	5.05	--			
59.60	4.50	14.80			

FIG4-4.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
-1.19	0.13	2.50
-0.21	1.35	6.25
-0.16	1.48	8.50
-0.11	1.64	8.80
-0.03	1.89	11.30
0.00	--	--
0.02	1.91	13.50
0.20	2.11	12.30
0.31	2.40	14.10
0.45	2.63	12.30
0.65	3.18	9.80
1.21	4.02	6.80
1.53	4.30	6.70
1.88	4.31	5.70
3.59	2.63	1.35
5.09	2.29	0.06
6.08	2.13	0.02
6.59	--	0.00
7.65	--	0.00
8.07	1.87	0.00
9.25	1.77	0.00

FIG4-5.SPG

Tiempo (horas)	Lipasa ext. (U/mL)	Biomasa (mg/mL)
0.00	0.03	0.00
8.00	0.05	0.00
10.50	0.08	0.00
12.00	0.10	0.00
14.00	0.13	0.00
16.00	0.14	0.10
19.00	0.17	1.25
21.25	0.18	1.75
23.00	0.24	2.15
30.00	0.30	4.50
40.00	0.35	5.60
44.00	0.34	6.25
49.00	0.35	6.10

FIG4-6.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.03	0.00
11.00	--	0.10
13.00	0.09	0.25
14.50	--	0.85
17.50	0.19	1.45
20.00	--	2.80
22.50	0.29	--
26.50	0.39	4.25
34.00	--	5.50
37.00	0.38	--
41.00	0.34	5.80
44.50	--	5.60

FIG4-7.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.45	0.00
10.00	0.70	0.00
12.00	1.05	0.25
14.50	1.40	0.75
16.00	1.75	0.90
17.00	2.05	4.90
19.50	2.22	7.30
22.50	2.20	7.10

FIG4-8.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-1.19	0.13	0.00	--
-0.21	1.35	1.30	--
-0.16	1.48	2.00	--
-0.11	1.64	4.50	--
-0.03	1.89	7.00	11.25
0.00	--	--	--
0.02	1.91	13.50	19.76
0.20	2.11	13.90	21.92
0.31	2.40	14.10	27.00
0.45	2.63	12.30	18.50
0.65	3.18	9.80	12.89
1.21	4.02	6.80	10.92
1.53	4.30	6.70	--
1.88	4.31	5.70	4.98
2.50	3.50	--	--
3.59	2.63	1.35	0.29
5.09	2.29	0.06	
6.08	2.13	0.02	
6.59	--	0.00	
7.65	--	0.00	
8.07	1.87	0.00	
9.25	1.77	0.00	

FIG4-11.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.08	0.00
12.25	0.35	0.00
13.75	0.47	0.80
15.25	0.64	1.50
16.50	0.77	2.80
18.00	1.05	5.50
20.00	1.38	6.80
21.75	1.54	8.00
23.00	1.54	7.20
34.50	1.29	5.45

FIG4-12.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-1.08	0.05	0.00	-0.03	10.92
-0.48	0.48	--	0.18	13.36
-0.21	1.30	3.75	0.36	19.76
-0.15	1.42	4.68	0.54	21.92
-0.09	1.48	6.06	0.72	32.55
-0.03	1.61	--	1.44	37.55
0.18	1.73	10.50	1.65	39.80
0.36	1.88	13.00	1.83	29.80
0.54	1.61	15.60	2.73	12.89
0.72	--	14.40	3.18	4.98
1.32	1.65	16.00	7.44	0.29
1.32	1.65	16.10		
1.65	1.52	14.00		
1.65	1.52	13.20		
1.83	1.61	15.80		
2.73	1.61	8.70		
2.97	1.61	8.20		
3.18	1.77	7.00		
3.42	1.73	6.50		
4.71	1.57	3.30		
6.27	1.61	1.60		
7.11	1.52	1.10		

FIG4-13A.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.23	0.00	0.00
18.00	2.18	9.50	--
20.75	2.36	12.60	15.85
22.25	2.54	17.90	21.60
23.25	3.51	9.10	22.43
24.75	3.76	10.10	17.94
26.75	4.29	12.40	16.83
28.50	4.56	9.60	14.61
29.75	4.93	2.00	19.70
30.50	5.67	5.60	19.40
32.50	5.70	7.60	14.30
33.50	6.07	10.00	11.28

FIG4-13B.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.15	0.00	0.00
18.00	1.30	2.60	--
18.75	1.43	3.00	--
20.25	1.58	6.80	8.15
21.75	1.64	8.00	8.21
23.25	2.06	5.80	9.70
24.75	2.02	7.20	11.30
26.25	2.30	8.80	15.71
27.75	2.38	9.00	15.20
29.25	2.56	11.60	22.90
30.75	2.85	13.00	12.46
32.25	2.84	9.05	17.66
33.75	3.20	9.30	20.64

FIG4-13C.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.03	0.00	0.00
17.00	0.45	0.00	--
18.00	0.46	0.20	--
20.00	0.70	0.00	--
21.50	0.88	0.10	--
22.50	1.17	0.70	0.01
24.50	1.16	1.10	2.34
26.50	1.47	1.80	9.15
28.00	1.60	2.00	11.98
29.50	1.89	5.10	17.01
32.50	2.16	13.40	22.91
34.00	2.35	12.90	35.67
36.25	2.28	16.70	45.30

FIG4-14.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.44	0.00
4.00	0.55	0.00
8.00	0.38	0.00
10.25	0.80	0.00
11.25	0.75	0.00
12.25	0.85	0.00
14.00	1.16	0.00
15.00	1.36	0.00
16.00	1.45	0.00
17.00	1.57	0.40
18.00	1.90	1.10
18.75	1.80	1.75
19.50	1.98	2.75
20.25	--	5.00
21.00	2.27	7.00
21.75	2.27	8.00
22.25	2.44	7.40
28.00	2.29	6.20
32.00	2.21	6.45

FIG4-15.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.09	0.00
4.00	0.24	0.00
6.00	0.27	0.00
7.00	0.35	0.00
8.50	0.43	0.00
10.00	0.54	0.00
11.25	0.64	0.06
12.25	0.63	0.15
13.25	0.66	0.17
14.25	0.64	0.15
15.00	0.70	0.20
25.00	0.77	0.21

FIG4-17.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Tiempo (horas)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.25	0.00	11.00	0.00
9.75	0.95	0.00	13.75	0.48
10.50	0.98	0.13	17.00	0.76
11.25	1.14	0.55		
12.50	1.15	1.60		
13.75	1.21	1.70		
16.25	1.36	1.80		
17.00	1.29	1.75		

FIG4-19.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
0.00	0.48	0.00
10.00	0.72	0.00
12.00	1.02	0.20
14.61	1.43	0.70
15.82	1.77	1.00
17.15	2.04	4.90
19.50	2.22	7.40
22.40	2.20	7.20

FIG4-21.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Tiempo (horas)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.74	0.00	15.00	0.53
13.50	2.49	0.45	--	--
15.00	2.94	0.35	21.00	0.96
16.50	3.40	1.00	25.00	0.71
18.00	3.43	1.60	27.00	0.73
19.75	3.74	4.00	40.00	0.38
21.00	4.30	5.60	--	--
22.00	--	6.60		
23.00	4.00	8.00		
24.00	--	8.00		
25.00	4.20	9.20		
26.00	--	10.30		
27.00	4.30	10.40		
28.00	--	10.70		
29.00	3.90	11.00		
38.25	3.90	--		
40.00	--	10.20		

FIG4-23.SPG

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.00	0.63	0.00	0.00
14.00	0.97	0.00	0.03
15.50	1.36	0.00	0.14
17.00	1.93	0.00	0.21
18.25	2.21	0.00	0.26
20.50	3.61	0.10	0.20
22.25	4.38	0.50	0.54
23.75	6.45	1.25	0.34
25.25	6.39	3.00	0.52
26.00	6.93	3.70	0.84
28.00	7.08	7.70	0.73
29.00	7.06	9.70	0.26
30.00	7.20	10.80	0.29
38.75	6.87	11.90	0.17
40.75	6.74	12.10	0.17

FIG4-25.SPG

Oleico (g/L)	$Y_{Lip/s}$	$Y_{Lip/X}$
0.50	0.42	0.34
1.00	1.80	1.76
2.00	3.60	4.19
4.00	2.62	3.12
8.00	1.51	1.81

FIG4-26.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-1.00	0.23	0.00	-0.04	1.94
-0.18	2.16	0.00	0.12	1.78
-0.04	2.42	1.40	0.31	3.20
0.00	--	4.00	1.27	6.31
0.12	2.27	3.00	3.07	5.47
0.31	2.35	3.90	4.78	4.88
1.27	2.07	10.50	6.16	5.15
1.75	2.03	7.50	7.27	5.78
1.93	--	8.90		
2.80	1.98	7.70		
3.07	2.05	7.40		
4.78	1.91	6.30		
6.16	2.01	7.50		
7.03	1.89	6.50		
7.27	2.05	6.30		

FIG4-27.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-1.00	0.23	0.00	-0.04	1.06
-0.18	2.16	0.00	0.12	0.97
-0.04	2.42	1.40	0.31	1.75
0.00	--	4.00	1.27	3.45
0.12	2.27	3.00	3.07	2.99
0.31	2.35	3.90	4.78	2.80
1.27	2.07	10.50	6.16	3.05
1.75	2.03	7.50	7.03	3.13
1.93	--	8.90	8.53	0.83
2.80	1.98	7.70	13.27	0.64
3.07	2.05	7.40	14.92	0.59
4.78	1.91	6.30	17.20	0.35
6.16	2.01	7.50	18.69	1.97
7.03	1.89	6.50	20.26	2.60
7.27	2.05	6.30	21.79	--
7.57	2.08	6.70	22.87	3.36
8.53	--	5.10		
8.89	2.17	3.50		
10.03	3.72	4.80		
11.71	2.11	3.50		
13.00	2.04	--		
13.27	2.03	2.60		
14.92	1.90	2.50		
16.24	1.90	3.10		
17.20	1.89	3.10		
17.62	1.79	2.90		
18.69	1.97	5.80		
19.03	--	7.90		
20.26	1.99	8.60		
20.56	1.88	10.20		
21.79	1.96	11.00		
22.87	1.93	11.00		
24.00	1.87	11.30		

FIG4-29.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
-1.21	0.11	0.00
-0.43	0.83	0.00
-0.30	1.01	0.00
-0.21	1.37	0.00
0.00	2.22	0.03
0.88	2.37	2.40
1.14	2.46	3.20
2.40	2.03	5.00
3.81	2.15	6.00
--	--	--
--	--	--
--	--	--
6.51	2.05	10.50
7.65	--	10.00
7.95	2.04	10.10
9.09	2.02	11.20
9.39	2.03	10.70
10.80	2.03	8.20
11.30	2.13	11.20
13.30	2.01	10.90
15.34	2.16	10.40

FIG4-31.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-1.55	0.16	0.00	7.68	4.18
-0.33	1.29	0.00	9.38	5.62
-0.23	1.36	0.00	10.05	5.56
0.00	1.95	0.10	14.60	2.67
0.43	1.74	0.65	15.56	3.66
2.28	2.04	4.50	17.39	4.38
3.30	2.15	5.30	22.27	3.35
5.55	2.10	3.40	23.47	2.67
6.95	2.17	4.80	25.35	2.77
7.68	2.11	3.80	32.21	5.62
9.38	2.03	3.70	33.36	5.36
9.70	--	3.40	35.85	6.06
10.05	2.14	3.70	39.50	4.14
11.85	2.25	3.70	42.93	4.39
12.68	2.12	3.10	43.55	4.52
14.60	2.07	2.90	49.94	6.40
15.56	2.05	3.10	50.56	6.34
17.39	1.94	3.60		
18.31	2.08	4.50		
20.51	2.00	12.20		
22.27	2.06	11.30		
23.47	1.98	12.00		
24.23	--	11.40		
25.35	2.05	11.70		
26.20	1.98	5.50		
28.79	2.01	1.80		
29.69	1.70	1.70		
32.21	1.86	2.50		
33.36	1.92	2.90		
35.85	1.86	3.70		
36.21	--	2.90		
37.45	1.79	48.00		
38.13	1.67	55.00		
38.62	1.79	62.00		
39.50	1.57	53.00		
40.00	--	62.00		
42.93	1.60	64.00		
43.55	1.50	60.50		
45.26	1.74	76.00		
46.00	1.89	79.00		
47.60	--	--		
48.41	--	--		
49.94	--	72.00		
50.56	--	79.00		

FIG4-32.SPG

t/tr	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )	t/tr	Proteína ext. (µg/mL)
-1.55	0.00	7.68	4.18	-0.33	12.58
-0.33	0.00	9.38	5.62	-0.23	8.98
-0.23	0.00	10.05	5.56	0.00	10.73
0.00	0.10	14.60	2.67	3.30	14.11
0.43	0.65	15.56	3.66	5.55	13.04
2.28	4.50	17.39	4.38	7.68	13.80
3.30	5.30	22.27	3.35	9.38	11.75
5.55	3.40	23.47	2.67	10.05	13.15
6.95	4.80	25.35	2.77	11.85	12.59
7.68	3.80	32.21	5.62	12.68	10.75
9.38	3.70	33.36	5.36	14.60	12.09
9.70	3.40	35.85	6.06	15.56	15.14
10.05	3.70	39.50	4.14	17.39	11.36
11.85	3.70	42.93	4.39	18.31	13.51
12.68	3.10	43.55	4.52	20.51	11.59
14.60	2.90	49.94	6.40	22.27	9.00
15.56	3.10	50.56	6.34	23.47	12.42
17.39	3.60			25.35	12.06
18.31	4.50			28.79	7.93
20.51	12.20			29.69	9.33
22.27	11.30			32.21	8.03
23.47	12.00			33.36	12.05
24.23	11.40			35.85	7.43
25.35	11.70			37.45	19.37
26.20	5.50			38.62	17.44
28.79	1.80			39.50	20.35
29.69	1.70			42.93	23.43
32.21	2.50			43.55	20.61
33.36	2.90			47.60	21.39
35.85	3.70			48.41	22.30
36.21	2.90			49.94	24.27
37.45	48.00			51.61	25.50
38.13	55.00				
38.62	62.00				
39.50	53.00				
40.00	62.00				
42.93	64.00				
43.55	60.50				
45.26	76.00				
46.00	79.00				
47.60	--				
48.41	--				
49.94	72.00				
50.56	79.00				

FIG4-33.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	t/tr	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
-0.70	0.28	0.00	4.56	1.00
-0.03	2.21	7.00	5.65	1.20
3.47	2.10	21.17	6.57	1.20
4.56	2.16	20.04	12.16	3.15
5.65	2.07	19.73	14.90	4.37
6.57	2.05	19.71	16.74	4.29
7.64	--	--		
9.95	1.87	17.90		
10.69	2.18	17.50		
11.49	--	19.80		
12.16	2.11	23.10		
12.89	--	25.90		
14.90	2.06	28.50		
16.74	2.08	26.10		

FIG4-34.SPG

t/tr	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)
-2.26	0.18	0.00
-0.08	2.22	1.94
0.70	1.92	4.46
1.25	1.63	4.33
3.43	1.40	0.21
5.27	0.75	0.00
7.45	0.80	0.00
8.54	0.61	0.00
11.19	0.65	0.00

FIG4-35.SPG

D (h <sup>-1</sup> )	Biomasa (mg/mL)	Lipasa ext. (U/mL)	Lipasa int. (U/mg <sub>biomasa</sub> )
0.03	2.05	27.00	--
0.05	2.10	19.00	--
0.06	2.05	10.75	3.30
0.08	2.06	10.83	2.70
0.10	2.13	3.80	5.50
0.12	2.05	3.20	4.40
0.14	1.88	2.90	5.60
0.16	0.70	0.00	--
0.17	0.00	0.00	0.00



FIG4-36.SPG

D (h <sup>-1</sup> )	D*Lip ext. (U/(mL*h))	D*Lip int. (U/(mg <sub>biomasa</sub> *h))
0.03	27.00	--
0.05	19.00	--
0.06	10.75	3.30
0.08	10.83	2.70
0.10	3.80	5.50
0.12	3.20	4.40
0.14	2.90	5.60
0.16	0.00	--
0.17	0.00	0.00

FIG4-37.SPG

D (h <sup>-1</sup> )	CER (mol/ (L*h)*10 <sup>5</sup> )	OUR (mol/ (L*h)*10 <sup>5</sup> )
0.03	140.00	300.00
0.05	175.00	400.00
0.06	250.00	580.00
0.08	310.00	725.00
0.10	340.00	800.00
0.12	400.00	945.00
0.14	400.00	950.00
0.16	70.00	165.00

FIG4-38.SPG

D (h <sup>-1</sup> )	CER/OUR
0.03	0.47
0.05	0.44
0.06	0.43
0.08	0.43
0.10	0.43
0.12	0.42
0.14	0.42
0.16	0.42





TUAB  
2924

Servei de Biblioteques

Reg. 225163

Sig \_\_\_\_\_

Ref 12500

