

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento Ingeniería Química



TESIS DOCTORAL

**Estudio del transporte y consumo de oxígeno en cultivos bacterianos
estrés hidrodinámico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sebastián Escobar Parra

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Emilio Gómez Castro

Madrid, 2014

Trabajo cofinanciado por el Fondo Social Europeo
y el Ministerio de Ciencia e Innovación



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Ingeniería Química



**ESTUDIO del TRANSPORTE y CONSUMO de OXÍGENO
en CULTIVOS BACTERIANOS: ESTRÉS
HIDRODINÁMICO**

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor

presenta:

SEBASTIÁN ESCOBAR PARRA

Madrid, 2013

El Dr. Félix García-Ochoa Soria, Catedrático de Ingeniería Química, y el Dr. Emilio Gómez Castro, Profesor Asociado de Universidad, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, que ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los Directores

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Dr. Emilio Gómez Castro

El Doctorando

Sebastián Escobar Parra

Agradecimientos

Cuando comencé la tarea de escribir la tesis, leí algunos manuales básicos sobre metodologías para la “elaboración de trabajos de doctorado”. Cada uno hacía énfasis en la dificultad mayor de éste o aquél capítulo, aunque he de decir en este párrafo inicial que ninguno acertó conmigo: la parte más difícil (aunque también la más agradable por cierto) ha sido la de dar las gracias. Dar las gracias es un acto de justicia, pero requiere de esa memoria que en su endeblez puede ser traicionera y desleal, así que espero que aquellas y aquellos a los que no nombro pero que eran merecedores de ello, no lo interpreten como desapego. Tal vez sea que la lista de lo trabajado cotidianamente, codo a codo con las gentes, es muy larga, yo demasiado agradecido, o que la tesis hay que terminarla de escribir de una vez por todas.

A la hora de escribir este capítulo de los agradecimientos recordé de la forma tan especial en la que lo hace Eduardo Galeano en su obra "Patatas Arriba. La escuela del mundo al revés". Comienza así: “Patatas arriba tiene muchos cómplices. Es un placer denunciarlos” (Galeano, 1998). Porque efectivamente se trata de “complicidad”. Permítanme que siga y, como el querido autor uruguayo, denuncie yo también a mis cómplices.

Sin duda, en primer lugar aparecen mis directores de tesis, Félix y Emilio, junto a los demás miembros del grupo de investigación, Vicky, Almu y Miguel, quienes me abrieron las puertas del laboratorio y sus oficinas para participar en este proyecto.

Agradezco al profesor Félix García-Ochoa, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras siempre acaloradas discusiones redundaran benéficamente tanto a nivel científico como personal. Su oportuno regreso del Ministerio hizo posible combatir codo a codo la imposible tarea de derrumbar a *Pseudomonas* en su intento de sobrevivir. Gracias por tu impresionante visión y claridad conceptual, orden, orientación, sabiduría y rigor; han sido clave para el desarrollo de esta tesis doctoral y serán siempre un ejemplo a seguir.

Al profesor Emilio Gómez, trabajador infatigable y oficioso quien no escatimó esfuerzos para acompañarme en todo este tiempo, afrontando mi estilo “demasiado latinoamericano” de escritura y aportándome siempre sus sabios consejos. Gracias por tu confianza, por tus acertadas orientaciones, y sobre todo por concluir con éxito la nada

fácil tarea de evitar que me derrumbe en las múltiples vicisitudes que han ocurrido durante la escritura de esta tesis.

A la profesora Victoria Santos, pilar científico, logístico y psicológico del laboratorio. Vicky es una mujer muy especial, que reúne las razones que me hicieron escoger este camino profesional: hace muchos años alguien me dijo que un “profesor” enseñaba determinados contenidos, mientras que un “maestro” era aquel que enseñaba para la vida. Gracias, Vicky.

En todo momento he contado con el inestimable apoyo de la profesora Almudena Alcón, que además de aportar sus conocimientos biológicos y bioquímicos, contribuyó a esta tesis con una importante dosis de acompañamiento, ánimo, apoyo, confianza e inspiración continua. Gracias por compartir tu tiempo, por tu dedicación, sabiduría, alegría, impulso y fuente indudable de conocimiento y experiencia. No sé que hubiera sido del Capítulo de la BDS sin tus acertados análisis y trabajo.

Quiero también dar las gracias al profesor Miguel Ladero, quien con su mágica columna para el HPLC hizo posible que pudiera por fin analizar el ácido glutámico. Sin dejar de mencionar por supuesto, su incondicional prestancia e invaluable amabilidad para debatir y aclarar cualquier inquietud científica y de la vida misma.

No con menos importancia, a pesar de la cuestión del orden, vienen ahora mis cómplices-compinches, el equipo “putido”... aquí es donde se fundan los recuerdos. Como decía Benedetti: “un recuerdo amorosamente fundado nos limpia los pulmones, nos aviva la sangre, nos sacude el otoño, nos renueva la piel y a veces convoca lo mejor que tenemos”. Así, ¡aparecen Javi, K, Vane, Patxi, Loli, Gon, Kike, Javi y Patri (mi querida partner)! En ellos, los de toda la vida, encontré una bonita amistad, confianza, amabilidad y buenos sentimientos. El haber compartido con ustedes esta tesis es lo que más agradezco al doctorado. Con Vane y Patxi hemos recorrido juntos este camino al que hoy pongo punto final. Pero sé que aún nos quedan más sueños por compartir o por vivir juntos. En el camino, se unió el tercer Javi, aparecieron los pupilos de Vane, tan incontables que no cabrían en este capítulo, pero que siempre estarán presentes, desde el memorable y pupilo único Bruno, pasando por Alberto y las mañanas de buena salsa, tangos, son, boleros y toda clase de matracas, hasta Mateo, Borja y Paula. Finalmente, se unió Susana, con quien alcanzamos a vivir la última etapa de mi estadía en el laboratorio. Siempre guardaré el anhelo de vernos algún día en Colombia, que les

conozca mi familia, que nos tomemos un jugo de lulo, un cafecito recién colado o un aguardiente, que escuchemos una gaita costeña, un acordeón o movamos las caderas a ritmo de salsa... Pero ante todo, que respiremos juntos ese aire tropical, fresco y puro de mi tierra colombiana. Del equipo “putido” también forma parte mi querida amiga Paqui. Gracias por compartir tu forma de ver la vida, tu alegría y confianza, pero sobre todo, gracias por tu trabajo.

Para el final dejo a mi familia, con el objetivo de que no me falte espacio para reconocer tanto como les debo.

Isa, mi compañera, ha sido paciente, abnegada e increíblemente cariñosa con esta actividad mía de tesista, que tanto tiempo le ha robado y que no sé si alguna vez podré recompensarle. Sé que pese a los esfuerzos que este trabajo nos ha impuesto a todos como familia, a tantos ratos sustraídos a la pareja, la única queja que me ha brindado siempre ha sido la de mi desorganización -de todos conocida-. Ella ha sido fuente e inspiración para cada una de estas líneas, que hermoso corazón tenés Isa. Espero que esta extraña forma mía de demostrarle amor (que raro se hace decirle a alguien que se le quiere mediante un estudio sobre el estrés en bacterias), funcione. Para vos está escrito el texto atribuido a Gabo que aparece más abajo. Iria, la muchacha hija de nuestra sinergia en el amor y con quien somos pueblo, es la heredera de este trabajo conjunto y la forjadora de nuestra realidad. De estos últimos meses con Iria conservaré siempre las hermosas sensaciones con las que me sentía apoyado incluso antes de que Isa hubiera “librado”: las pataditas nocturnas en mi espalda, a través del vientre abultado de más de 6 meses de su mamá, casi me hacían cosquillas en la espalda, un suave ronroneo por caricia que me llevaba a un sueño profundo, y me ayudaba a dejar de pensar en la tesis y descansar.

A mis adorados mamá y papá, demás mamás, papás, hermanas, hermanos y sobrinitos y sobrinitas... ¡toda la tribu! A pesar de la distancia física, no han sido ajenos a este trabajo. Durante todo este tiempo no me ha abandonado el olor a papaya, mangos y aguacate, a cafecito recién colado y a bifloras, ni el sonido del son, la salsa y los boleros. Ellos, mi familia, nunca se han separado de mis anhelos, porque de ellos provengo, a ellos les debo lo bueno que pueda haber en mí y en este trabajo, ¡la alegría de vivir! Lo malo... Eso es sólo cosa mía. A mi familia madrileña, con los que ahora se agranda la tribu, muchas gracias por su cariño y apoyo incondicional.

Finalmente, a quienes no pude acompañar en el dolor o el descanso de la muerte, por haber estado tan lejos al elegir este camino. Nunca he dejado de regocijarme admirando cada maravilla hecha vida, porque sé que ustedes andan por allí. Sé que ustedes son la sonrisa de Iria.

Deseo asimismo, agradecer el apoyo económico a este trabajo por parte del Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación a través de la financiación de los proyectos de investigación CTQ2007-60919/PPQ y CTQ2010-15464/PPQ y de la acción complementaria CTQ2011-12725-E, acompañados del Programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador (Programa FPI), cofinanciado por el Fondo Social Europeo. Asimismo, quiero dar las gracias al Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación UCM-BSCH por la financiación concedida al Grupo de Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (GR35/10-A910134).

Que vivan los estudiantes,
jardín de nuestra alegría,
son aves que no se asustan
de animal ni policía.
Y no le asustan las balas
ni el ladrar de la jauría.
Caramba y zamba la cosa,
que viva la astronomía!

Me gustan los estudiantes
que rugen como los vientos
cuando les meten al oído
sotanas y regimientos.
Pajarillos libertarios
igual que los elementos.
Caramba y zamba la cosa,
que viva el experimento!

Me gustan los estudiantes
porque levantan el pecho
cuando les dicen harina
sabiéndose que es afrecho.
Y no hacen el sordomudo
cuando se presente el hecho.
Caramba y zamba la cosa,
el código del derecho!

Me gustan los estudiantes
porque son la levadura
del pan que saldrá del horno
con toda su sabrosura.
Para la boca del pobre
que come con amargura.
Caramba y zamba la cosa,
viva la literatura!

Me gustan los estudiantes
que marchan sobre las ruinas,
con las banderas en alto
va toda la estudiantina.

Son químicos y doctores,
cirujanos y dentistas.
Caramba y zamba la cosa,
vivan los especialistas!

Me gustan los estudiantes
que con muy clara elocuencia
a la bolsa negra sacra
le bajó las indulgencias.
Porque, hasta cuándo nos dura
señores, la penitencia.
Caramba y zamba la cosa,
que viva toda la ciencia!
caramba y zamba la cosa,
que viva toda la ciencia!

Violeta Parra

Si supiera que esta fuera la última vez
que te vea salir por la puerta, te daría un
abrazo, un beso y te llamaría de nuevo
para darte más. Si supiera que esta fuera
la última vez que voy a oír tu voz,
grabaría cada una de tus palabras para
poder oírlas una y otra vez
indefinidamente.

Si supiera que estos son los últimos
minutos que te veo diría “te quiero” y
no asumiría, tontamente, que ya lo
sabes. Siempre hay un mañana y la vida
nos da otra oportunidad para hacer las
cosas bien, pero por si me equivoco y
hoy es todo lo que nos queda, me
gustaría decirte cuanto te quiero, que
nunca te olvidaré.

Atribuido a:

Gabriel Garcia Márquez

ÍNDICE

SUMMARY	1
INTRODUCTION	1
AIM OF THIS WORK	2
MATERIALS AND METHODS	3
RESULTS AND DISCUSSION	6
CONCLUSIONS	8
REFERENCES	10
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. EL PAPEL del OXÍGENO en los BIOPROCESOS AEROBIOS	17
1.2. La RELACIÓN entre OTR y OUR en los BIOPROCESOS	20
1.3. ESTRÉS HIDRODINÁMICO	34
1.3.1. Mecanismos de daño celular	38
1.3.2. Métodos experimentales de evaluación de la sensibilidad de las células al estrés hidrodinámico	41
1.3.3. Indicadores de estrés hidrodinámico	43
1.4. BIODESULFURACIÓN de DBT	47
1.5. OBJETO y ALCANCE DEL TRABAJO	52
1.6. BIBLIOGRAFIA	54
2. MATERIALES Y MÉTODOS	71
2.1. MATERIALES EMPLEADOS	71
2.1.1. Microorganismos	71
2.1.2. Reactivos	75
2.1.3. Composición de los medios empleados	77
2.2. EQUIPOS	80
2.2.1. Equipos para el cultivo de células	81
2.2.2. Equipos de medida y análisis	89
2.2.3. Equipos auxiliares	92
2.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES	94
2.3.1. Procedimientos experimentales	94

2.3.1.1.	Conservación del microorganismo.....	94
2.3.1.2.	Preparación del inóculo.....	95
2.3.1.3.	Cultivo del microorganismo en biorreactor.....	97
2.3.1.4.	Experimentos de biodesulfuración en <i>resting cells</i>	100
2.3.1.5.	Medida de las actividades enzimáticas.....	101
2.3.1.6.	Medida de las velocidades de transporte (OTR) y consumo de oxígeno (OUR).....	102
2.3.2.	Métodos de análisis.....	105
2.3.2.1.	Análisis de la biomasa.....	105
2.3.2.2.	Medida de la concentración de glicerol y de ácido glutámico.....	107
2.3.2.3.	Seguimiento de la capacidad desulfurante.....	108
2.4.	MÉTODOS DE ESTIMACIÓN Y AJUSTE.....	111
2.4.1.	Método de estimación de k_{La}	111
2.4.2.	Métodos matemáticos de ajuste.....	116
2.5.	BIBLIOGRAFIA.....	119
3.	CRECIMIENTO DE <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8.....	127
3.1.	CINÉTICA del CRECIMIENTO: VARIACIÓN de las CONCENTRACIONES de BIOMASA y de OXÍGENO DISUELTO....	131
3.1.1.	Resultados experimentales.....	131
3.1.2.	Discusión de los resultados.....	142
3.1.3.	Modelo Cinético del Crecimiento.....	147
3.2.	MEDIDA del TRANSPORTE y del CONSUMO de OXÍGENO.....	153
3.2.1.	Resultados experimentales.....	154
3.2.2.	Discusión de los Resultados.....	156
3.2.3.	Modelo Cinético del Consumo de Oxígeno (OUR).....	159
3.3.	MÉTODO RAPIDO para determinar CONDICIONES de ESTRÉS.....	172
3.4.	BIBLIOGRAFIA.....	177
4.	CRECIMIENTO DE <i>Pseudomonas putida</i>.....	185
4.1.	CINÉTICA del CRECIMIENTO de <i>Pseudomonas putida</i> KTH2: VARIACIÓN de los PARÁMETROS del CULTIVO.....	187
4.1.1.	Resultados experimentales.....	188
4.1.1.1.	Discusión de los resultados.....	201

4.1.2.	Modelo cinético del crecimiento.....	207
4.1.3.	Análisis de la velocidad de consumo de oxígeno.....	218
4.1.3.1.	Discusión de los resultados	223
4.2.	CINÉTICA del CRECIMIENTO de <i>Pseudomonas putida</i> natural: VARIACIÓN de los PARÁMETROS del CULTIVO	228
4.2.1.	Resultados experimentales	228
4.2.1.1.	Discusión de los resultados	241
4.2.2.	Modelo cinético del crecimiento.....	246
4.2.3.	Análisis de la velocidad de consumo de oxígeno.....	254
4.2.3.1.	Discusión de los resultados	258
4.3.	BIBLIOGRAFIA.....	263
5. CAPACIDAD DESULFURANTE y CONDICIONES FLUIDODINÁMICAS		269
5.1.	CAPACIDAD DESULFURANTE de <i>R. erythropolis</i> IGTS8.....	271
5.1.1.	Resultados experimentales	272
5.1.2.	Discusión de los resultados	282
5.2.	CAPACIDAD DESULFURANTE de <i>Pseudomonas putida</i> KTH2.....	288
5.2.1.	Resultados experimentales	289
5.2.2.	Discusión de los resultados	295
5.3.	ESTUDIO de las ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS en <i>P. putida</i> KTH2	300
5.3.1.	Resultados experimentales	300
5.3.2.	Discusión de los resultados	304
5.4.	BIBLIOGRAFIA.....	313
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....		317
6.1.	RESUMEN.....	317
6.2.	CONCLUSIONES.....	322
6.3.	BIBLIOGRAFIA.....	328
7. NOMENCLATURA		333

SUMMARY

SUMMARY

INTRODUCTION

Aerobic bioprocesses are gas-liquid-solid systems involving simultaneous mass transfer and biochemical reactions of several chemical species. Thus, it is required to ensure a good contact between the three phases (gas-liquid-solid) present in the system in order to a correct bioprocess design and operation. In most of the cases the transport from gas phase to liquid phase is the limiting step of the overall process rate, mainly due the low solubility of oxygen in the growth medium (Garcia-Ochoa et al., 2010). For this reason, oxygen must be continuously supplied and dispersed into the broths by a gas phase (air flowing) to satisfy the oxygen demand of the cells. Under these conditions, the oxygen transfer rate (OTR) as well as the oxygen uptake rate (OUR) are key aspects involved in the design, operation and scale-up of bioreactors. Consequently, aeration and agitation are the most important variables in order to produce an effective oxygen transfer rate into the growth medium.

However, although an increase in the stirrer speed and gas flow improved the oxygen mass transfer rate in the system, these increases can also produce a change in the fluid dynamic behaviour, involving higher turbulence intensity, and thus the shear stress can be exacerbated.

The effect of turbulence on suspended cells is one of the most complex problems in the scale-up of cell cultures, because shear effects of flow turbulence inside the bioreactor may have an important impact on several aspects. For example, among others, on growth and production rates (Palomares and Ramírez, 1996; Çalik et al., 2004; Garcia-Ochoa et al., 2013), on product synthesis by selection of metabolic routes (Arrojo et al., 2006), due to the transport rate of nutrients affecting the enzyme

activities, on oxygen dissolved concentration, on broth viscosity, and as a result on hydrodynamic stress and cell damage (Märkl y Bronnenmeier, 1985; Merchuk, 1991; McCloskey, 2011).

The microorganisms that have been employed throughout this work to study the influence of the hydrodynamic conditions on the biomass growth and the metabolites production are capable of carrying out the process denominated biodesulphurization (BDS). BDS is a promising process for some petrochemical fraction desulfurization using microorganisms, their enzymes or cellular extracts as catalysts to remove the sulphur present in fuels (Gupta et al., 2005). The BDS biocatalysts are microorganisms selected for their ability to specifically degrade some organic-sulphur compounds. One of such is a wild type, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, while the other is a genetic modified microorganism (GMO), *Pseudomonas putida* KTH2.

Usually BDS is studied using model compounds, being dibenzothiophene (DBT) the most utilized. The most employed metabolic pathway in BDS studies is a non-destructive aerobic pathway known as 4S route, first reported in the bacterium *R. erythropolis* IGTS8 (Kilbane and Jackowski, 1992). This desulphurization pathway is named as 4S route, because the DBT molecule is transformed into 2-hydroxibiphenyl (HBP) and sulphite (McFarland et al., 1999), following a reaction scheme formed by four consecutive reactions or steps (Oldfield et al., 1997).

AIM OF THIS WORK

The aim of this work is to study the effect of hydrodynamic conditions on aerobic bacterial cultures under different operational conditions in a stirred and sparged tank bioreactor. The microorganisms that will be used belong to the genus *Rhodococcus* and *Pseudomonas*.

In order to do this, the growth of both microorganisms will be studied, culturing the cells under different operational conditions, modifying the stirrer speed and gas flow rate, because these variables are the most relevant in a stirred sparged tank bioreactor for changing both mass transfer rate and fluid dynamic conditions. As a result, the effect of long-term hydrodynamic stress on some macro-level aspects, such as different physiological magnitudes relevant to the cells growth, the effect on the oxygen transfer

and oxygen uptake rates, and the DBT desulphurization capacity as a metabolic hydrodynamic stress indicator, will be studied.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture medium

The microorganisms used were *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* KTH2 and *Pseudomonas putida* wild type, supplied by the Biological Research Centre (CIB-CSIC, Madrid, Spain). *R. erythropolis* IGTS8 strain was maintained at 4 °C on LB-Agar plates and it was transferred every 5 days. *Pseudomonas putida* strains were concentrated, resuspended with a glycerol in saline serum (50%) solution and conserved at -80 °C.

For inoculum built-up a complex medium was employed LB (Luria-Bertani), that has the following composition: 1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, and 1 % NaCl. In *P. putida* KTH2 cultures, the LB medium also contain a solution of tetracycline ($25 \cdot 10^{-3}$ g/L).

To carry out the growth, all the microorganisms were cultured in a standard medium (BSM), with the following composition: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0245 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L; glycerine, 2%; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L; NH_4Cl , 2 g/L. In *R. erythropolis* IGTS8 cultures, the BSM medium contains DMSO (1.3 mM) as sulfur source, glucose (20 g/L) as carbon source and TRIS buffer (12,1 g/L of TRIS and 5,8 g/L of NaCl). pH TRIS buffer should be adjusted to a value of 7.3 with HCl. In *P. putida* cultures, the BSM medium contains $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.4437 g/L) as sulfur source; glutamic acid (20 g/L) as carbon source; and in addition, liquid silicone antifoaming (0.5 mL/L) was added. pH was not either adjusted or controlled during the process. In *P. putida* KTH2 cultures, a solution of tetracycline ($25 \cdot 10^{-3}$ g/L) and IPTG ($2 \cdot 10^{-6}$ g/L) was also added in order to only let the modified strain growth.

Cell suspension cultures

Experiments in shaken flask were carried out in 250 mL Erlenmeyer containing 50 mL of the medium on an orbital shaker (Gallenkamp, Model INR-200) with shaking diameter of 34 mm and shaking frequency of 210 rpm. Work temperature employed was 30 °C.

Experiments in bioreactor were carried out on a stirred tank bioreactor (STBR), made by Sartorius BBI Systems (BIOSTAT® B plus), with 2 L working volume, equipped with pH, dissolved oxygen concentration, temperature and foam probes. Agitation was provided by two-disk turbine stirrer type with the relative dimensions between the stirrer and the tank diameter (D/T) of 1/3. Each turbine was made by six blades 1 mm thick. The stirrer was driven by a mixing head equipped with a speed controller. A 4 cm diameter ring type gas sparger with holes of 0.5 mm in diameter was employed as gas distributor. In the case of *P. putida* cultures, deflector panels and an anti-foam disk were used. Work temperature was maintained constant at 30 °C.

Experimental procedure

- Microorganisms growth

To obtain repetitive results, the microorganisms were grown using a standardized procedure (Martin et al., 2004 and 2005; Olmo et al., 2005a and 2005b). Frozen stocks were used as inoculum and two consecutive growth stages were performed in Luria-Bertani (LB) complex medium in Erlenmeyer flasks. These cells were inoculated (10 %) into a commercial 2 L bioreactor, where the microorganism is grown using basal salt synthetic medium (BSM).

- Biodesulphurization assays

In order to estimate the cell desulphurising capability, a resting cell desulphurization assays was realized using cells previously collected from cultures carried out under different operational conditions at selected growth times. Cells were suspended in 100 mL Erlenmeyer flask, containing 16 mL of 50 mM HEPES buffer (pH 8.0) and 25 µM DBT (*R. erythropolis* IGTS8 cultures case) and 10 µM DBT (*P. putida* KTH2 cultures case), with an initial biomass concentration of 0.7 g/L. Desulphurization was carried out at 30 °C and 210 rpm in an orbital shaker for 120 min and samples of 0.5 mL were collected periodically for their analysis.

- OUR and OTR measurement

Two techniques have been employed depending on the culture conditions: in the case of *R. erythropolis* IGTS8 cultures, the **dynamic method** was used (Garcia-Ochoa and Gomez, 2010), and in the case of *P. putida* cultures, due to the high oxygen demand of this microorganism, OUR and k_{La} can not be acceptably determined by using the classical dynamic method. The so called **process method** was used; according to this method it is necessary first to know OTR through the k_{La} estimation, using a predictive model, which has been previously developed and described by this researching group (Garcia-Ochoa and Gomez 2004; Garcia-Ochoa and Gomez 2005; Garcia-Ochoa and Gomez, 2010; Santos et al., 2006).

Analytical Methods

The evolution of biomass during growth was determined as optical density at 600 nm (OD 600) measured in a Shimadzu UV-vis spectrophotometer (model UV-1603). HPLC with a RID and UV detectors was employed to analyze the carbon source concentration (glycerol and glutamic acid) and all the 4S route compounds: DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS and HBP (Calzada et al., 2007).

Mathematical Methods

In order to obtain the calibrated equations for quantitative analysis and the values of the kinetic parameters of the growth (kinetic model), these parameters have been obtained by fitting to the experimental data. A linear regression was used to obtain the calibration equations. The fitting method to the experimental data to obtain the kinetic model parameters has been a non-linear and single-response method, which was coupled to a numeric integration algorithm in order to use integral data (concentrations vs. time). The algorithm used for the non-linear fitting was NL2SOL and the integration algorithm used was the implicit Euler method.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth study

- *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

The growth of *R. erythropolis* IGTS8 has been studied in an orbital shaker and in a 2 L STBR. In order to obtain a wide range of hydrodynamic conditions, the stirrer speed was changed from 100 to 700 rpm, and the gas flow, from 1 to 10 L/min. During the growth stage, biomass and dissolved oxygen evolution were evaluated throughout growth time. Likewise, OUR and OTR have been measured (Garcia-Ochoa and Gomez, 2010).

After the analysis of the experimental results, as physiological responses of cells to different hydrodynamic conditions established during cultivation, the growth rate was described by means of a simple kinetic model, such as the logistic equation. This model reproduces satisfactorily the biomass experimental values for all the runs carried out under different dynamic conditions. In order to analyze the effects of hydrodynamics on growth, an "effectiveness factor" for growth, η , was defined as the relationship between the specific growth rate and the experimental specific growth rate without nutrient limitation or cell damage ($\eta = \mu/\mu^*$). From the experimental results and the parameters of the kinetic model it can be inferred that the growth rate (and the parameters η y C_x^{\max}) change with the stirrer speed values, but hardly are affected when air flow rate is changed.

From the experimental data of OUR, OTR and the biomass concentration, the values of the q_{O_2} and k_{La} , were calculated.

Finally, as a consequence of these observations, a simple and rapid method has been proposed, which makes possible to determine under what hydrodynamic conditions the growth is limited by mixing phenomena or by oxygen transfer rate or, in the opposite side, the cells may be affected by the stress, hydrodynamic or oxidative, which is notably influencing his behaviour.

- *Pseudomonas putida*

The growth of *Pseudomonas putida* KTH2 has been studied in an orbital shaker and in a 2 L STBR at agitation from 100 to 2000 rpm, in order to obtain a wide range of hydrodynamic conditions. Now, during the growth stage, biomass, dissolved oxygen, carbon source (glycerol and glutamic acid) and pH evolution were evaluated.

In light of the results obtained from the aforementioned magnitudes, it can be concluded that *P. putida* KTH2 presents two types of behaviour depending on the stirrer speed being employed for said culture: first, low stirrer speeds (100 to 500 rpm) represent growth limiting oxygen transport conditions; on the other hand, higher stirrer speeds (600 to 2000 rpm) represent non-growth limiting oxygen transport conditions, which simultaneously does not cause damage to the cells.

The growth rate has been described using a complex Monod equation capable of reproducing satisfactorily the two types of behaviour observed in the growth of *P. putida*. Consequently, it was possible to analyze the effects of the hydrodynamic on growth through evolution of η in function of N .

Likewise, the OUR was evaluated throughout the growth under the influence of the stirrer speed. From the experimental data of OUR and biomass concentration, the specific oxygen uptake rate values, q_{O_2} , have been calculated.

Finally, for a deep study about the behaviour observed in *P. putida* KTH2, an analogous study with the wild type strain of *Pseudomonas*, *P. putida* wild type, was carried out. Accordingly, the analyzed results indicated that *P. putida* wild type showed an analogous behavior to that of the GMO. Therefore, it can be affirmed that the growth behaviour of *P. putida* KTH2 is not due to its GMO condition, but to a specificity of the genus *Pseudomonas*, at least under the conditions (growth medium composition, temperature, pH, hydrodynamics) employed in this work

Study of DBT biodesulphurization

To check the influence of the hydrodynamic conditions on the biodesulphurization capability development during the growth of *R. erythropolis* IGTS8 and *P. putida* KTH2 bacteria, both types of microorganisms were grown under different stirrer speeds: in the *R. erythropolis* IGTS8 case, cells were grown from 100 to 700 rpm, and,

in the *P. putida* KTH2 case, cells were grown from 100 to 800 rpm. Subsequently, independently for each experiment and each microorganism, desulphurizing capacity developed by such cells through assays of DBT biodesulphurization in resting cells conditions was measured.

Also, in the case of *P. putida* KTH2, taking into account that the different compounds involved in the 4S route (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS and HBP) are not accumulated inside the cells, an intracellular enzyme activity study can be carried out, monitoring in this way the activity of DszC and DszA monooxygenases and DszB desulphinase enzymes.

CONCLUSIONS

Rhodococcus erythropolis bacteria

The growth rate of *R. erythropolis* IGTS8 it is clearly influenced by the stirrer speed. The growth rate is increased when the stirrer speed is increased up to 250 rpm. When the stirrer speed is increased from 250 until 450 rpm, the cell concentration throughout the time of growth is very similar. Finally, it has been found that when using agitation above 450 rpm, growth appears to be affected and as a result the growth rate is lower. This shows two situations, at low N, OTR controls the growth, and at high N, there is a hydrodynamic or oxidative stress.

The q_{O_2} values obtained show that the hydrodynamic conditions influence the growth in a similar way to that when the growth rate, and the corresponding kinetic parameters are considered (C_x vs t , or the parameters η y C_x^{\max}). Therefore, it can be used as a characteristic parameter of OTR control ($OTR < OUR$), of a metabolic control situation ($OTR \geq OUR$) and a stress situation, when q_{O_2} decreases from certain values of the stirrer speed.

An agitation increase from 100 to 450 rpm has a positive influence on the development of the BDS capacity of the cells during growth. However, the growth of *R. erythropolis* IGTS8 using agitation above 450 rpm, has a clearly negative effect. Therefore, it is possible to conclude that *R. erythropolis* IGTS8 suffers a stress situation

when the growth takes place at agitation above 450 rpm. This is a critical value for both growth and the BDS capacity development.

***Pseudomonas putida* bacteria**

The growth rate of *P. putida* KTH2 is controlled by the oxygen transfer rate at low stirrer speeds. If the stirrer speed is increased from 100 to 600 rpm, the growth rate is increased too. At stirrer speeds above 600 rpm, the growth rate is not controlled by OTR and take similar values from 600 to 2000 rpm. This fact and the results observed in the evolution of the growth characteristics parameters (dissolved oxygen and carbon source -glycerol and glutamic acid concentrations and pH with time) clearly point out that there are not fluid dynamic restrictions producing stress or cell damage in *P. putida* KTH2 cultures.

q_{O_2} is also an indicator of the influence of the hydrodynamics conditions over growth, that clearly shows two types of behaviour: under microaerobic conditions, (from 100 to 500 rpm), q_{O_2} takes a maximum value at the beginning of growth, and decreases in a hyperbolic way as a function of the cell concentration. On the other hand, under non-growth limiting conditions (from 600-2000 rpm), q_{O_2} shows an evolution in function of the cell concentration that is practically lineal and decreasing, as it can be waited.

In the *P. putida* KTH2 case, under low stirrer speed (from 100 to 300 rpm), the BDS capability that the cells develop during growth does not show any relevant differences. On the other hand, under operational conditions where the agitation is high (from 500 to 800 rpm), the development of the BDS capacity of the cells during growth suffers a drastic decrease. This means that an improvement of the oxygen transfer at the culture medium favours the growth of *P. putida* KTH2, but the BDS capacity is affected drastically. Likewise, the results of the intracellular enzyme activity study shows that the aforementioned differences in the influence of the hydrodynamic conditions on the BDS capability is clearly due to the fact that all 4S route enzymes are being affected by high stirrer speeds (from 500 rpm), particularly DszB enzyme (from 100 rpm), which is the enzyme catalyzing the last reaction of the 4S pathway, that is controlling the overall process rate (biodesulphurization).

REFERENCES

- Arrojo**, B.; Mosquera-Corral, A.; Campos, J.L. and Mendez, R., **2006**. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *J. Biotechnol.* **23**, 453-463.
- Çalik**, P.; Yilgör P.; Ayhan P. and Demir A.S., **2004**. Oxygen effects on benzaldehydelyase production. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5075-5083.
- Calzada**, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A.; Santos, V.E.; Garcia , J.L. and Garcia -Ochoa, F., **2007**. Intracellular activity of the enzymes involved in 4S route biodesulphurization of DBT by *Pseudomonas putida* CECT5279 as function of cell age. *J. Biotech.* **131S**, S74-S97.
- Garcia-Ochoa**, F. and **Gomez**, E., **2004**. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 2489-2501.
- Garcia-Ochoa**, F. and **Gomez**, E., **2005**. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 771-772.
- Garcia-Ochoa**, F.; Gomez E.; Santos, V. E. and Merchuk, J.C., **2010**. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* **49**, 289-307.
- Garcia-Ochoa**, F.; Gomez, E.; Alcon, A. and Santos, V.E., **2013**. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 911-925.
- Gomez**,E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. and Garcia-Ochoa F., **2006**. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability, *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.
- Gupta**, N.; Roychoudhury, P.K. and Deb, J.K., **2005**. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 356-366.
- Kilbane**, II, J.J. and **Jackowski**, K., **1992**. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1107-1114.

Martin A.B.; Alcon A.; Santos V.E. and Garcia-Ochoa F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy Fuels*. **18**, 851-857.

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. and Garcia-Ochoa F., **2005**. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: influence of the operational conditions, *Energy Fuels*. **19**, 775-782.

Märk, H. and **Bronnenmeier**, R., **1985**. Mechanical stress and microbial production. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*. Verlagsgesellschaft, Weinheim. **2**, 369-392.

McCloskey, K.E., **2011**. Effects of shear stress on cells. *Comprehensive Biotechnol.* **1**, 615-623.

McFarland, B.L., **1999**. Biodesulfurization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 257-264.

Merchuk, J.C., **1991**. Shear effects on suspended Cells. *Advances Bio. Eng.* **44**, 65, 1-31.

Palomares, L.A. and **Ramirez** O., **1996**. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*. **22**, 225-237.

Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. and Kulpa, C., **1997**. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology*. **143**, 2961-2973.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. and Garcia-Ochoa, F., **2005a**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Olmo, C.H., Santos, V.E., Alcon, A. and Garcia-Ochoa, F., **2005b**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **22**, 229-237.

Santos, V.E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. and Garcia-Ochoa, F., **2006**. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochem. Eng. J.* **32**, 198-204.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El sector de la industria química genera una variedad de productos sin los cuales sería difícil concebir el desarrollo de otros sectores, como por ejemplo el textil, el sanitario, el de la alimentación y nutrición, la vivienda, el entretenimiento y ocio, el transporte o el turismo. La industria química, por lo tanto, podría considerarse la gran factoría que cubre las necesidades de la vida humana (Hall y Howe, 2010).

En general, todo proceso productivo en la industria química tiene lugar mediante la aplicación de un conjunto de técnicas que se desarrollan en etapas o fases. La etapa de tratamientos previos, en la que las materias primas se preparan y acondicionan para el proceso químico, lo que implica la utilización de un conjunto de operaciones básicas basadas en la transferencia de materia y de calor, el manejo de sólidos, el movimiento de fluidos, etc. A continuación se llevan a cabo los procesos químicos y, en la actualidad, los bioquímicos y biológicos, que tienen lugar en un reactor y que transforman las materias primas en productos. Finalmente es necesario una etapa de tratamientos posteriores para el aislamiento y la purificación de los productos de interés, lo que supone, de nuevo, un conjunto de operaciones básicas.

Este conjunto de técnicas han hecho posible disponer de una gran cantidad de productos que han impulsado el desarrollo, el crecimiento económico y la prosperidad de nuestras sociedades. Sin embargo, y a la luz del concepto de desarrollo sostenible, el

futuro de la industria química debe ser visto en la actualidad como el de un sector inseparable de la biotecnología (García-Serna y col., 2007).

Por Biotecnología se entiende toda aquella aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos, o para la obtención de un bien o servicio útil para el hombre. La biotecnología moderna es un campo interdisciplinar que supone, hoy día, una prioridad para el sector industrial, y su implementación requiere del conocimiento y la aplicación de la microbiología, la biología molecular, la ingeniería enzimática, la ingeniería metabólica de microorganismos, así como de la ingeniería química en los procesos industriales para la producción de nuevas sustancias, materiales y energía de origen biológico (Singh y Ghosh, 2004). La biotecnología blanca o industrial propone avances significativos para la economía y el medio ambiente si se compara con los métodos de producción de la química convencional, debido a que se beneficia de unas condiciones suaves de operación, una eficiencia de conversión en aumento, una mejora en la obtención de productos de mayor pureza, así como de un uso más rentable de la energía y también de una menor formación de residuos químicos (Takors, 2012).

Los bioprocesos forman parte esencial de muchos sectores de la industria química, como el farmacéutico y el alimentario, en los que se hace uso de microorganismos, células de animales o plantas y componentes celulares, tales como enzimas, para la elaboración de nuevos productos o la obtención de un servicio (como en el tratamiento de aguas residuales). Los distintos tipos de bioprocesos se pueden clasificar según la clase de transformación que incluyan. Algunas de estas posibles transformaciones son (Díaz, 2012):

- i. Síntesis celular.
- ii. Producción enzimática.
- iii. Producción de metabolitos (primarios y secundarios).
- iv. Procesos de transformación de materiales, que a su vez agrupan procesos de separación, transformaciones hidrolíticas, mezcla de componentes y transformaciones microbianas.

Para llevar a cabo las reacciones bioquímicas que conducen a la transformación y producción de sustancias químicas y biológicas que implican el uso de biocatalizadores (enzimas libres o inmovilizadas, microorganismos, células vegetales y animales), se realizan procesos biotecnológicos que tienen lugar en equipos específicos denominados biorreactores. Un biorreactor es un aparato en el cual se transforman las sustancias sobre las que se trabaja, utilizando para ello células vivas o componentes celulares, como enzimas, capaces de producir una transformación bioquímica de una manera controlada. Un biorreactor tiene que ser diseñado de manera que los organismos vivos o las enzimas puedan emplearse en condiciones definidas y óptimas para que se produzcan los cambios bioquímicos buscados (Henzler, 2000).

1.1. EL PAPEL del OXÍGENO en los BIOPROCESOS AEROBIOS

Los dos mecanismos de generación de energía metabólica útil, en forma de ATP (adenosina trifosfato), que pueden utilizar los microorganismos son:

- Fermentación: reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos que ocurren en ausencia de oxígeno, sin la participación de la cadena de transporte de electrones. En este caso, las moléculas orgánicas actúan como dadores y aceptores de electrones.
- Respiración: reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos o inorgánicos, con la participación de la cadena de transporte de electrones. Según la naturaleza del aceptor final de electrones la respiración puede ser:
 - ✓ Aerobia: cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones.
 - ✓ Anaerobia: cuando el aceptor es un compuesto inorgánico oxidado diferente del oxígeno, como el nitrato (desnitrificación) o el sulfato.

El metabolismo respiratorio rinde más energía para la célula que el metabolismo fermentativo. La fermentación requiere un gran consumo de materia orgánica para mantener la misma biomasa que la respiración; por tanto, en condiciones aerobias, la respiración tiende a prevalecer sobre la fermentación. La otra gran fase metabólica, en la cual tiene lugar la biosíntesis enzimática de las moléculas orgánicas a partir de sus precursores sencillos, constituye el anabolismo. Esta fase precisa del consumo de

energía química aportada por el ATP generado durante el catabolismo. Ambos procesos, catabolismo y anabolismo, se regulan independientemente, si bien comparten algunos ciclos comunes y ambos se desarrollan de forma simultánea y concurrente en las células.

Así, se puede afirmar que la respiración es una parte del metabolismo, más precisamente del catabolismo, en la que las células obtienen energía de diferentes moléculas orgánicas, como la glucosa, a través de una serie de reacciones complejas, que incluyen la glucólisis, la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (como se esquematiza en la Figura 1.1), en las que el carbono es oxidado y el oxígeno procedente del exterior es el agente oxidante empleado. Durante la respiración, parte de esa energía es utilizada para sintetizar ATP, que a su vez proporciona la energía necesaria para las reacciones de síntesis de proteínas, de enzimas, y de otras sustancias (anabolismo), capacitando al microorganismo para llevar a cabo el crecimiento y el mantenimiento celular. En consecuencia, entre los diversos factores nutricionales que influyen en los bioprocesos aerobios, el oxígeno es el sustrato clave utilizado por las células para generar la energía necesaria útil para llevar a cabo las reacciones de síntesis con las que el organismo se "fabricará" a sí mismo, y la requerida para el mantenimiento celular. Por esta razón, el oxígeno disuelto en el medio de cultivo tiene tanta importancia en los procesos aerobios.

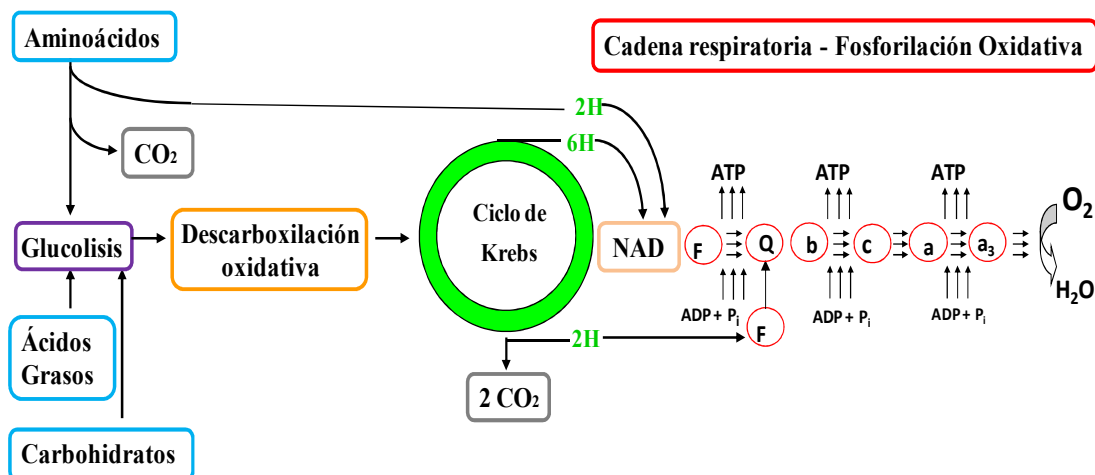


Figura 1.1 - Ruta de oxidación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. El símbolo *F* designa el NADH y succinato deshidrogenasa. *Q* es la Coenzima A, y *b*, *c*, *a* y *a*₃ designan los citocromos.

El oxígeno presenta una baja solubilidad en los caldos de cultivo, que son generalmente soluciones acuosas, por lo que no se puede introducir como si fuera otro nutriente más: el oxígeno debe ser continuamente suministrado por una fase gas (aire) al medio líquido, con el fin de proporcionar al microorganismo la cantidad de oxígeno en disolución que requiere. Una concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo por debajo de un valor crítico puede alterar las rutas y los flujos metabólicos de las células, pudiendo afectar notablemente las velocidades de crecimiento y de formación de producto (Li y col., 2011; Olmos y col., 2013), la producción de un metabolito específico (Yang y Wang, 1992b; Zhou y col., 1992), la producción de otro metabolito distinto al deseado (Moes y col., 1985; Galindo y Herrera 1989; Leckie y col., 1991; Bourne y col., 1992) e incluso causar daños irreversibles en las células (Çalik y col., 1997; Bandaipheth y Prasertsan, 2006).

El tipo de microorganismo, la temperatura del caldo de cultivo, la escala de operación (que a su vez puede modificar las condiciones hidrodinámicas del sistema) y la oxidación de los sustratos son aspectos claves en la determinación de los niveles críticos de oxígeno disuelto en las fermentaciones (Chisti, 2000). El valor de la concentración crítica para la mayoría de los organismos está en el orden de 0,1 a 1 mg/L , valor relativamente bajo si se compara con el de la solubilidad del oxígeno, que a 30 °C y 0,21 atmósferas, en medios acuosos diluidos es del orden de 7,8 mg/L . Esto podría conducir a suponer que no constituye un problema satisfacer los requerimientos de oxígeno de las células en los cultivos sumergidos, pero todo lo contrario, para la respiración de una población de células vegetales con una concentración de biomasa de 30 g/L , puede calcularse que el contenido de oxígeno del caldo debe renovarse alrededor de 1,2 veces por minuto para mantener su demanda ($3,6 \cdot 10^{-6} g_{O_2} / g \cdot s$). Así, en los caldos de cultivo que contienen elevada concentración de células con altos requerimientos de oxígeno disuelto y con gran viscosidad hay una alta probabilidad de limitación de oxígeno durante el bioproceso (García-Ochoa y col., 2000a y 2013). Todos estos aspectos son fundamentales en el diseño de biorreactores destinados a cultivos aerobios, ya que deberán ser capaces de suministrar oxígeno (alta velocidad de transporte) con el fin de satisfacer la demanda.

La evolución de la concentración de oxígeno disuelto en un biorreactor va a depender de la velocidad a la que se transporta (*oxygen transfer rate*, OTR) y de la

velocidad a la que es consumido por el microorganismo (*oxygen uptake rate*, OUR). Tanto OTR como OUR son parámetros claves que están implicados en el diseño, operación y cambio de escala de los biorreactores, debido a que la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo depende de los procesos de transporte y consumo.

1.2. La RELACIÓN entre OTR y OUR en los BIOPROCESOS

Los bioprocesos aerobios envuelven el transporte de materia y reacciones bioquímicas de una o más especies, simultáneamente. Los biorreactores en los que se llevan a cabo bioprocesos aerobios son sistemas heterogéneos gas-líquido-sólido, donde la fase gaseosa es el aire, la fase líquida es el medio de cultivo y la fase sólida es el microorganismo, aunque suele considerarse como un sistema G-L, en un tratamiento pseudo-homogéneo de la fase líquida, donde el microorganismo se considera un componente más de la misma, denominado biomasa. Por lo tanto, un apropiado diseño del biorreactor debe estar dirigido a proporcionar las condiciones ambientales (temperatura, presión, pH, mezcla, hidrodinámica, etc.) y nutricionales (oxígeno disuelto, fuente de carbono, etc.) que permitan conseguir un óptimo crecimiento de las células o alcanzar altos rendimientos en la formación del(os) producto(s). Entre los varios factores que influyen en el bioproceso, como se destacaba en el apartado anterior, el oxígeno es un parámetro crítico, ya que es el único nutriente que debe ser suministrado continuamente al biorreactor (García-Ochoa y col., 2010).

Debido al papel fundamental que cumple el oxígeno en el crecimiento y el metabolismo celular, es imprescindible que, tanto la etapa de transporte de oxígeno al sistema, como la demanda de oxígeno por parte de los microorganismos, sean bien comprendidas y analizadas en cada caso (García-Ochoa y Gómez, 2009; García-Ochoa y col., 2010). Así, OTR y OUR tienen una importancia decisiva, ya que la etapa correspondiente al transporte de oxígeno del aire al medio líquido es a menudo la que controla la velocidad global del proceso. En estas condiciones, la aireación y la agitación de los biorreactores son aspectos importantes a fin de producir una velocidad de transferencia de oxígeno eficaz en el medio de cultivo.

El transporte de oxígeno a pequeña escala, como el que se efectúa en un matraz *Erlenmeyer* agitado, se lleva a cabo gracias a la acción giratoria proporcionada por una incubadora orbital o de vaivén lateral. En biorreactores de mayor escala (laboratorio, piloto e industrial), se debe disponer de un sistema de aireación y mezclado del cultivo adecuado. Así, el reactor tipo tanque con agitación convencional incluye un distribuidor de gas y un sistema de agitación mecánico consistente en un eje vertical con uno o varios agitadores, movido por un motor. Dispone además de varios deflectores (usualmente entre 4 y 6), cuya anchura representa el 10 % del diámetro del recipiente, localizado a lo largo del perímetro del reactor con objeto de fomentar la turbulencia.

Las principales variables que influyen en la velocidad de transferencia de materia, en reactores agitados mecánicamente, son las siguientes (Van't Riet, 1979; Nishikawa y col., 1981; Garcia-Ochoa y Gomez, 1998):

- i) Los parámetros geométricos del tanque, principalmente los siguientes:
 - Dimensiones de la vasija.
 - Agitador, incluyendo diversos aspectos:
 - a) Tipo de agitador: paleta simple, turbina, hélice, etc.
 - b) Número de palas y forma de las mismas.
 - c) Número de agitadores y sus dimensiones.
 - Difusor de gas:
 - a) Forma y distribución de los orificios.
 - b) Diámetro de los orificios.
- ii) Las propiedades del fluido: viscosidad, densidad, tensión superficial, etc.
- iii) La energía disipada en el fluido, que depende a su vez del caudal de aire y de la velocidad de agitación.

Todo esto lleva consigo la necesidad de un estudio exhaustivo del diseño y de las condiciones de operación en los biorreactores, con el fin de establecer las condiciones óptimas para la biotransformación. En este sentido, la mezcla, mediante la

agitación y la aireación, se usa para asegurar una distribución homogénea de los nutrientes en la fase líquida y mejorar la transferencia de materia (especialmente la del oxígeno).

El grado de agitación está relacionado con la potencia suministrada al líquido, que normalmente se refiere al volumen del biorreactor. El nivel de agitación tiene una importancia decisiva, ya que la agitación aumenta el área de transferencia de materia, debido a la generación de burbujas de pequeño tamaño que se dispersan en el líquido, y con un mayor tiempo de residencia en su interior. Además, una buena agitación favorece la turbulencia y, por tanto, de acuerdo al modelo de la doble película, disminuye el espesor de la película líquida en la interfase G-L, incrementando la velocidad de transporte.

En cuanto al caudal de aire, su influencia está relacionada con el tamaño de las burbujas y a la fracción de gas retenida en la dispersión gas-líquido (*hold-up*) que forma el caldo. Si el tamaño de las burbujas es pequeño, las burbujas suben más lentamente y el valor del área superficial de contacto por unidad de volumen en el fermentador aumenta; por lo tanto, la transferencia de oxígeno se ve favorecida (Diaz, 2012; Doran, 2013). Por otro lado, el caudal de aire suministrado al biorreactor normalmente se encuentra en un intervalo de valores estrecho (entre 0,15 y 1,5 vvm) debido a las limitaciones de circulación. Si se utilizan caudales de gas elevados, la velocidad superficial de las burbujas (definida como la relación entre el caudal de gas y la sección transversal del tanque), es alta, lo que provoca que éstas asciendan solo por el centro y que presenten bajos tiempos de residencia en el biorreactor. Por consiguiente, si se quiere distribuir uniformemente las burbujas, es necesario usar una velocidad de agitación elevada, aunque esto puede desencadenar que se presenten fenómenos de cavitación.

La influencia de los factores y fenómenos antes mencionados han sido objeto de numerosos estudios en una amplia variedad de bioprocesos aerobios. Así, König y col. (1981), al analizar la influencia de la transferencia del oxígeno sobre la velocidad de crecimiento y la producción de penicilina en cultivos de *Penicillium chrysogenum*, mostraron que la velocidad de transporte puede influir de manera independiente en el crecimiento y en la formación del producto. Belmer-Being y Thomas (1993), mostraron que la producción de amoxicilina/ácido clavulánico por *S. clavuligerus* decrece con el

aumento en la velocidad de agitación durante el cultivo de las células. A su vez, Kaya-Çeliker y col. (2009), al estudiar la velocidad de crecimiento y la producción de benzaldehído liasa por *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLySs, encontraron que las necesidades de oxígeno para cada actividad metabólica era diferente. Otros autores, como Mehmood y col. (2011), encontraron que una alta velocidad de agitación resulta en una mayor concentración de biomasa, lo cual promueve una temprana limitación de nutrientes y por consiguiente una temprana inducción de la producción de pristinamicina por *Streptomyces pristinaespiralis*. Finalmente, Garcia-Ochoa y col. (2000b y 2013), establecieron en diferentes trabajos que el crecimiento del cultivo de la bacteria *Xantomonas campestris* y la producción de goma de xantano dependen de las condiciones de operación establecidas en el biorreactor, principalmente de la velocidad de agitación.

La transferencia de oxígeno desde una burbuja de gas a la célula puede ser descrita a través de los siguientes 9 pasos o etapas (Figura 1.2 a y b) (Moo-Young y Blanch, 1987; Garcia-Ochoa y col., 2010; Doran, 2013):

1. Transferencia desde el interior de la burbuja a la interfase gas-líquido.
2. Equilibrio en la interfase gas-líquido.
3. Difusión a través de la película líquida relativamente estancada alrededor de la burbuja.
4. Transporte a través del seno del líquido.
5. Difusión a través de la película líquida, relativamente estancada, que se encuentra alrededor de las células.
6. Transporte a través de la membrana celular. Si las células están en un flóculo, agrupadas o como una partícula sólida, se tendrá que tener en cuenta, además, la difusión a través del flóculo hasta la célula individual.
7. Transporte a través del citoplasma hasta el lugar donde la reacción bioquímica tiene lugar.

8. Reacciones bioquímicas, normalmente catalizadas por enzimas, que implican consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono u otros gases
9. Transferencia del gas producido en la dirección contraria.

Los pasos comprendidos entre el punto 1 y 7, así como el 9, corresponden a fenómenos o etapas físicas, en principio bien conocidos y más fáciles de describir que los fenómenos bioquímicos (paso 8), que suponen una compleja red de reacciones.

La etapa correspondiente al transporte de oxígeno del aire al medio líquido es, a menudo, la etapa controlante de todo el proceso (paso 3), debido a la baja solubilidad que presentan los gases en los líquidos y al pequeño gradiente de concentración que se establece (Moo-Young y Blanch, 1987; Doran, 2013). El paso 4, con frecuencia, tiene poca importancia cuando la fase líquida se somete a una agitación suficiente. No obstante, puede ser significativo en aquellos procesos industriales con baja agitación o cuando se utilizan fermentadores no agitados, ya que se puede producir una limitación de oxígeno. Por otro lado, puede tener gran relevancia en situaciones opuestas, ya que al favorecer el transporte, con un aumento de la agitación, debe considerarse a su vez el posible estrés o daño que puedan sufrir las células por los fenómenos hidrodinámicos que puedan acontecer en el fluido (Midler y Finn, 1966; Bronnenmeier y Märkl, 1982; Merchuk, 1991; Díaz, 2012; Escobar y col., 2012).

La resistencia de la capa líquida que rodea las burbujas de gas suelen controlar la velocidad global de transferencia de materia y el problema del transporte de oxígeno se reduce así a la transferencia de materia en la interfase gas-líquido (Van't Riet, 1983; Blanch y Clark, 1997).

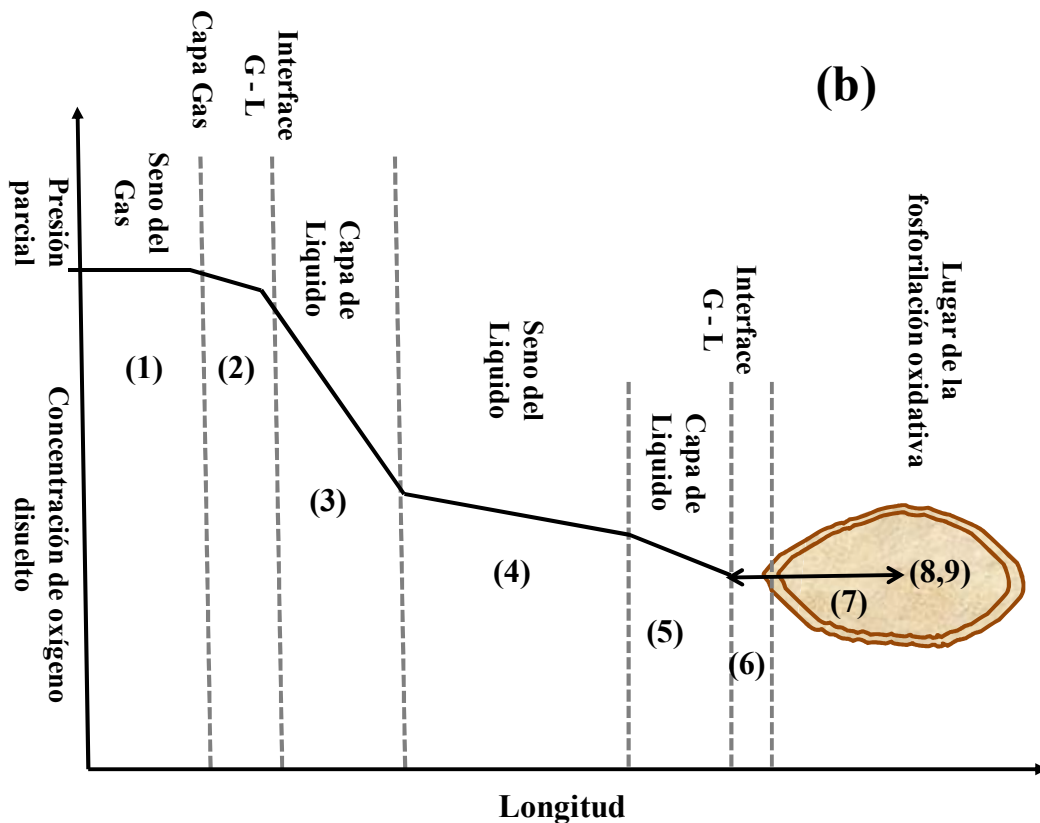
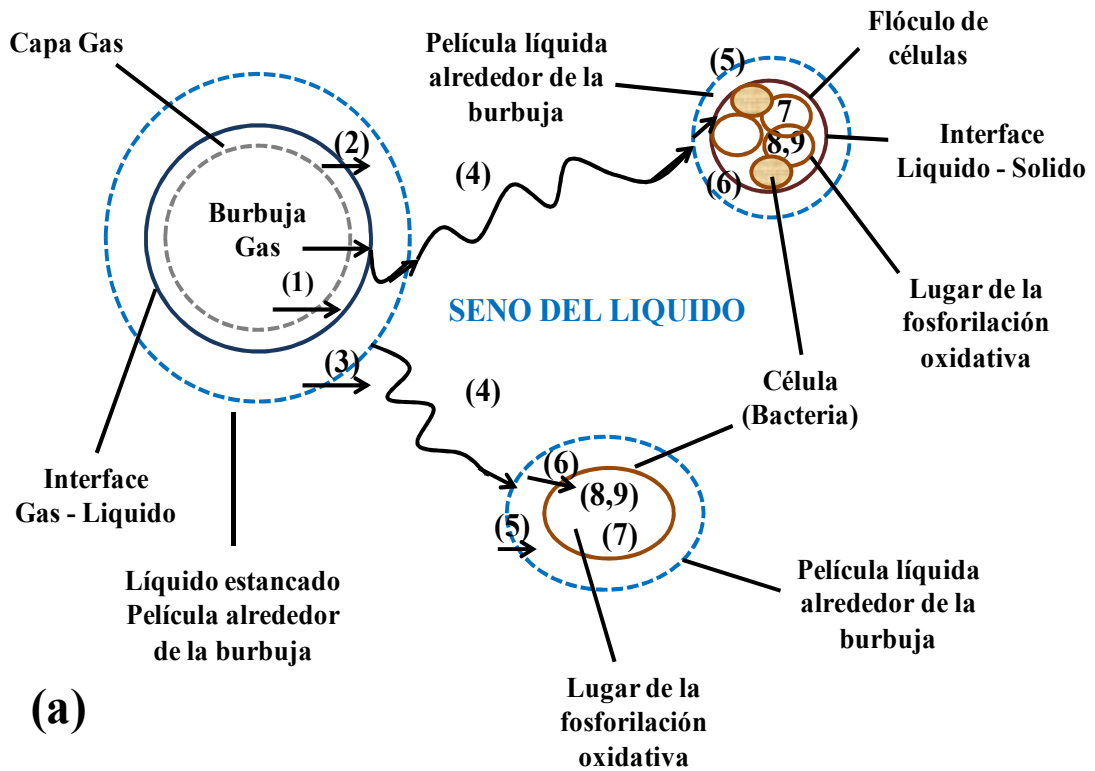


Figura 1.2 - (a) Representación de las etapas y resistencias a la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire hasta el interior de la célula en células libres y agregados celulares. (b) Evolución del perfil de concentración de oxígeno desde una burbuja de gas a la célula (adaptado de Garcia-Ochoa y col., 2010).

La teoría más simple sobre la transferencia de materia es el modelo de la doble película (Whitman, 1923), y, por lo general, la velocidad de transferencia de materia es modelizada de acuerdo a esta teoría. De acuerdo a esta aproximación, la resistencia a la transferencia de materia en cada fase se localiza en la capa delgada cercana a la interfase, que se supone que no ofrece ninguna resistencia al transporte. La transferencia de materia a través de la capa estancada de líquido que rodea la burbuja se transfiere por difusión molecular a lo largo de un gradiente de concentración que puede ser asumido lineal, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1.3. En el estado estacionario, el flujo molar de oxígeno, J_0 , a través de cada una de las dos películas, se puede expresar como el producto entre la fuerza impulsora y el coeficiente de transferencia de materia según:

$$J_0 = k_G \cdot (p_G - p_i) = k_L \cdot (C_i - C_{O_2}) \quad [1.1]$$

siendo J_0 el flujo molar de oxígeno a través de la interfase gas-líquido; k_G y k_L , los coeficientes locales de transferencia de materia; p_G , la presión parcial de oxígeno en la burbuja de gas; C_{O_2} , la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido; y los subíndices i se refieren a las mismas magnitudes en la interfase gas-líquido.

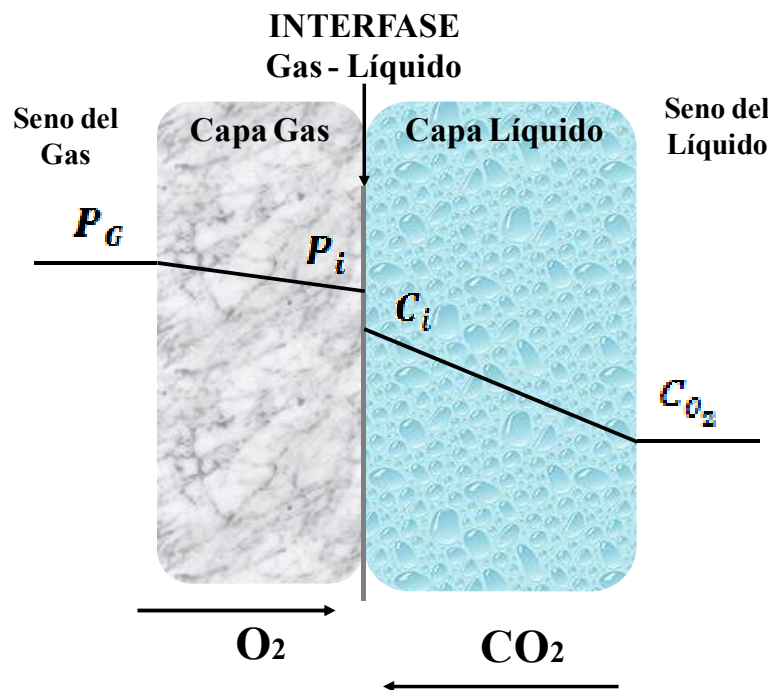


Figura 1.3 - Representación esquemática de la interfase gas-líquido, y el coeficiente de transferencia de materia de acuerdo a la teoría de la doble película (adaptado de Garcia-Ochoa y Gomez, 2010).

Debido a que la concentración en la interfase no puede ser medida directamente y considerando el coeficiente de transferencia de materia global, la Ec. [1.1] puede ser escrita como:

$$J_0 = K_G \cdot (p_G - p_{O_2}^*) = K_L \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [1.2]$$

donde $p_{O_2}^*$ es la presión de oxígeno en el equilibrio con la fase líquida; $C_{O_2}^*$ es la concentración de saturación en el seno del líquido en equilibrio con la presión parcial de oxígeno en la fase gas; y K_G y K_L los coeficiente globales de transferencia de materia.

La presión parcial y la concentración de oxígeno, en el equilibrio, están relacionadas de acuerdo a la ley de Henry, al menos en el caso de gases poco solubles:

$$p_{O_2}^* = He \cdot C_{O_2}^* \quad [1.3]$$

Por lo que combinando las Ecs. [1.1] a [1.3], se obtiene la siguiente relación:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{He \cdot k_G} + \frac{1}{k_L} \quad [1.4]$$

Teniendo en cuenta que la fase gas presenta mayor velocidad de difusión y que el oxígeno es muy poco soluble en el agua (He es muy grande), se acepta comúnmente que la mayor resistencia de transferencia de materia está en el lado líquido de la interfase y la resistencia de la fase gaseosa, por lo general, se puede despreciar, y así, el coeficiente global de transferencia de materia es igual al coeficiente local: $K_L \approx k_L$. Considerando el área interfacial específica por unidad de volumen, a , la OTR se puede escribir como:

$$OTR = a \cdot J_0 = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [1.5]$$

donde $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia.

La Ec. [1.5] implica que esencialmente toda la resistencia a la transferencia de oxígeno se localiza en la película líquida y que OTR depende del coeficiente de transferencia de materia, el área interfacial de gas-líquido, y del gradiente entre la concentración del oxígeno en la interfase y la concentración en el seno del líquido (concentración media).

Como ha podido observarse, son muchos los factores que hay que tener en cuenta a la hora de conseguir una OTR adecuada en los biorreactores; además debe tenerse en cuenta que la composición y las propiedades hidrodinámicas del medio, en un cultivo discontinuo, cambian con el tiempo, afectando a su vez al transporte G-L. Las condiciones hidrodinámicas y la energía disipada en el biorreactor juegan un importante papel, ya que permiten que tengan lugar diferentes fenómenos simultáneamente. La importancia relativa de estos fenómenos cambia con la escala, el tipo de biorreactor, los requerimientos del microorganismo, el bioproceso que se lleva a cabo, etc. La interrelación entre las condiciones hidrodinámicas y los diversos factores que influyen en OTR se muestra en la Figura 1.4.

La transferencia de oxígeno es un fenómeno físico, por consiguiente, OTR puede ser predicho, mientras que el consumo de oxígeno supone un complejo metabolismo que envuelve una red de reacciones bioquímicas y, por tanto, necesariamente, debe ser determinado experimentalmente (Gomez y col., 2006). Como indica la Ec. [1.5], OTR es descrita como una magnitud proporcional al gradiente de concentración, donde la constante de proporcionalidad es el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$. Este parámetro se determina experimentalmente aplicando diferentes técnicas de medida o métodos (químicos, físicos y biológicos); los más importantes se describen en la Tabla 1.1. Por otro lado, los valores experimentales de $k_L a$ se pueden encontrar correlacionados mediante ecuaciones empíricas (Garcia-Ochoa y Gomez, 2005), aunque su posible utilización es muy limitada, pues la extrapolación de un sistema a otro es difícil en la mayoría de los casos (Gomez, 1995; Garcia-Ochoa y Gomez, 1998). En los últimos años, se han desarrollado modelos teóricos para su predicción con muy buenos resultados (Kawase y col., 1992a y b; Garcia-Ochoa y Gomez, 2004 y 2005). Estos métodos predictivos se basan, a su vez, en el esquema mostrado en la Figura 1.4.

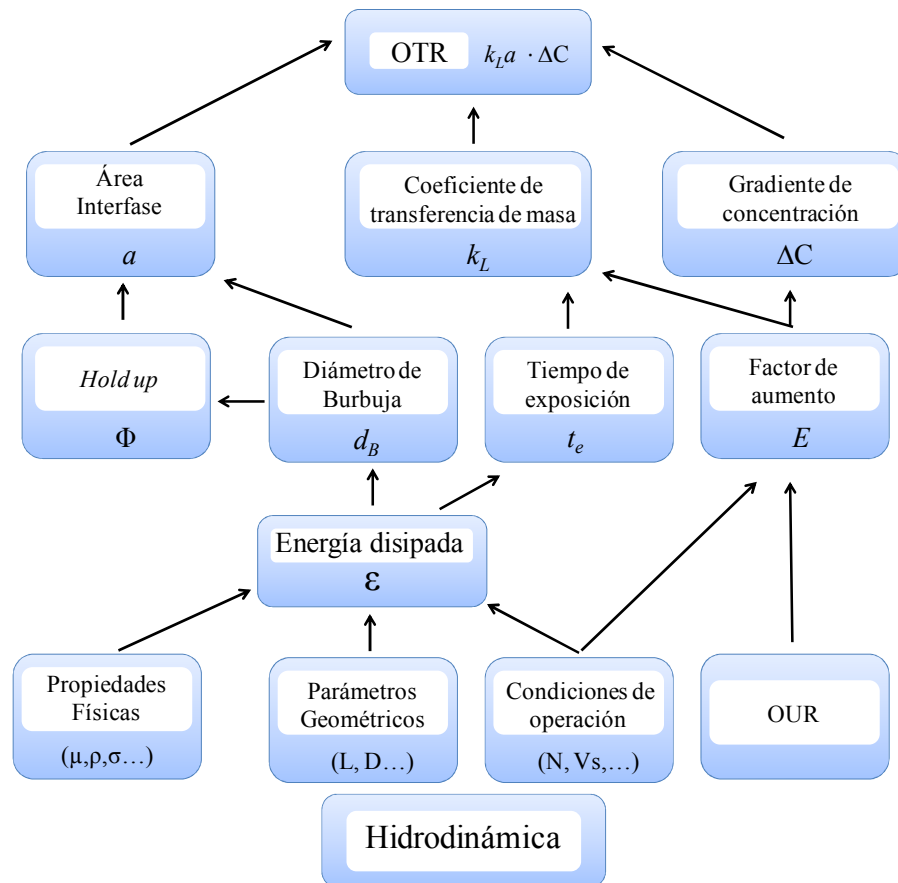


Figura 1.4 - Relaciones entre las condiciones hidrodinámicas del biorreactor y los diferentes parámetros que afectan a OTR (adaptado de Garcia-Ochoa y Gomez, 2010).

El consumo de oxígeno es otro de los aspectos más importantes de los procesos aerobios llevados a cabo con microorganismos. La velocidad a la que este nutriente es utilizado por las células se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo celular, la velocidad de crecimiento de las células y la concentración de la biomasa. Conocer el consumo de oxígeno real del microorganismo permite determinar los requerimientos energéticos y del proceso de operación (aireación y agitación). Son, también, muchos los factores que influyen en la demanda de oxígeno, siendo los más importantes la especie celular utilizada, la fase de crecimiento del cultivo y la naturaleza de la fuente de carbono en el medio, además del proceso que se persiga: crecimiento, producción de metabolitos o ambos.

Se suele distinguir, por un lado, la velocidad global de consumo, OUR, y, por otro lado, la velocidad de consumo específico (q_{O_2}) cuando el primero se refiere al consumo de oxígeno por unidad de biomasa. Es importante destacar que ninguno de los dos es constante a lo largo del crecimiento celular (Garcia-Ochoa y col., 2000a y 2010).

En cultivos discontinuos, la velocidad de consumo de oxígeno varía con el tiempo, debido, principalmente, a que la concentración de células aumenta durante el proceso y a que se producen cambios fisiológicos de las células en las diferentes fases de crecimiento. Por otro lado, cuando la concentración de oxígeno disuelto en el líquido se sitúa por debajo de un cierto nivel crítico, la velocidad específica de consumo de oxígeno depende también de la concentración de oxígeno en el medio. En la Figura 1.5 se muestra una evolución típica de OUR, de q_{O_2} y de la concentración de oxígeno disuelto (OD) durante el crecimiento de un microorganismo aerobio.

OUR ha sido utilizada como una magnitud para obtener información importante acerca de la actividad metabólica de las células en el cultivo. A su vez, se ha empleado para una estimación *on-line* de la concentración de células viables, para la determinación de la fase de crecimiento de insectos (Kamen y col., 1996; Palomares y Ramírez, 1996) y cultivos de células de mamíferos (Zhang y col., 1991), y para la caracterización de compuestos orgánicos en el tratamiento de residuos (Deshpande y Heinzle, 2004 y Tremier y col., 2005) o su actividad (Palomares y col., 2004; Schäfer y col., 2004; Ganesh y col., 2006). Recientemente OUR ha sido propuesta como un factor que indica el posible estrés hidrodinámico o daño que pueden sufrir las células (García-Ochoa y col., 2013).

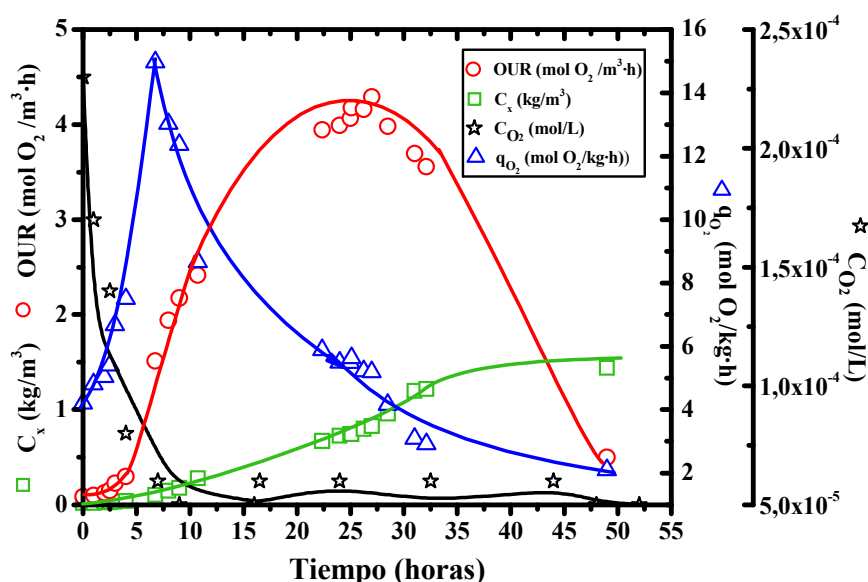


Figura 1.5 - Evolución típica de la concentración de oxígeno disuelto, C_{O_2} , la velocidad de consumo de oxígeno, OUR, la velocidad específica de consumo de oxígeno, q_{O_2} , y la evolución de la concentración celular, C_x , a lo largo del tiempo de fermentación en cultivos de *X. campestris* (adaptado de García-Ochoa y col., 2000a).

Aunque tradicionalmente OTR y OUR no han sido descritas juntas, e incluso se desarrollaron una variedad de técnicas o métodos experimentales (Tabla 1.1) para determinar ambos parámetros (García-Ochoa y col., 2010), hoy en día lo habitual es obtener ambos valores usando la misma técnica; así, por ejemplo, algunos de los métodos biológicos permiten la determinación simultánea de OUR y OTR (o $k_L a$), en el mismo experimento.

Una vez que un bioproceso en particular es realizado con éxito en experimentos a escala de laboratorio, lo habitual es que luego se lleve a cabo en un número de biorreactores de escala cada vez mayor, hasta la optimización del proceso final a una escala de planta piloto, donde las condiciones de operación y la hidrodinámica del sistema son similares a los utilizados en la escala de producción.

El cambio de escala en bioprocesos es una etapa clave y altamente compleja, pues, por un lado, supone procesos en los que intervienen un número muy elevado de variables, a veces muy difíciles de controlar, y, por otro lado, son sistemas heterogéneos (G-L-S). Así pues, algunas de las principales dificultades que se presentan son:

- a) Presencia de una mayor cantidad de materia y necesidad de una mayor cantidad de energía al aumentar el volumen del sistema.
- b) Dificultad de poner en contacto las tres fases (gas, líquido y células), lo cual condiciona la velocidad a la que se da el proceso.

Por tanto, algunos de los factores a tener en cuenta en el cambio de escala son:

- Transferencia de materia entre las distintas fases. La etapa limitante suele ser el transporte G-L, es decir, el transporte del oxígeno al medio de cultivo.
- Transformaciones bioquímicas dentro del propio microorganismo, que suelen ser un entramado de reacciones enzimáticas, de óxido-reducción, de degradación de sustratos o de síntesis de productos y de producción de energía. La complejidad del sistema reaccionante es tal que, habitualmente, se considera al microorganismo como un simple catalizador; sin embargo, este enfoque se ha mostrado, en algunos casos, claramente insuficiente.
- Aparición de nuevos fenómenos. Suelen ser consecuencia de alguno de los fenómenos anteriores, haciendo que el sistema no se comporte de la forma

esperada. Entre ellos, es relevante citar las situaciones de estrés, que pueden provocar daño celular de diverso tipo.

En el caso del cambio de escala de bioprocesos aerobios, el efecto del transporte de materia gas-líquido es el factor más significativo. Por consiguiente, se tiende a mantener el coeficiente de transporte, $k_L a$, constante, o si el valor de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, C_{O_2} , es despreciable comparado con el valor de saturación ($C_{O_2}^*$) mantener constante OTR (Figueiredo y Calderbank, 1979; Herbs y col., 1992; Garcia-Ochoa y col., 2000a; Bandaipheth y Prasertsan, 2006).

En muchos casos, conseguir elevados valores de concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo requiere velocidades de transporte de oxígeno muy altas; esto puede suponer una seria dificultad en biorreactores industriales. Para ello, como se mencionó previamente, en el caso de biorreactores de tanque agitado y aireado, es necesario optimizar dos variables fundamentales, la velocidad de agitación y el caudal de aire (Yépez y Maugeri, 2005). Sin embargo, aunque en principio una mayor velocidad de agitación favorece el transporte de oxígeno en el sistema, también supone un cambio en el comportamiento fluidodinámico del mismo, ya que esto lleva consigo tiempos de mezcla diferentes y una diversa intensidad de la turbulencia, por lo que las fuerzas de cizallamiento se pueden ver agravadas con el aumento de escala de los biorreactores. Debido a estas condiciones, se puede ocasionar un daño celular al microorganismo por estrés hidrodinámico (Merchuk, 1991).

Tabla 1.1 - Resumen de diferentes métodos experimentales para calcular OTR y OUR (adaptado de Garcia-Ochoa y Gomez, 2010).

	Método de medida	Escala	Tiempo de ensayo	Supuestos/inconvenientes	
Químicos	Oxidación de sulfito	Laboratorio	Horas	La velocidad de reacción se asume de orden cero respecto al sulfito. Alteración del coeficiente de difusión y la coalescencia. Este método es bastante laborioso	
	Absorción de CO_2	Solución alcalina	Laboratorio	Minutos	Conocer la cinética de la reacción. Cambios en el comportamiento de la coalescencia
		Medida dinámica del pH	Cualquier escala	½ hora	Conocer la cinética de la reacción. La adición de sal no debe modificar la velocidad de transferencia de materia de C_{O_2}
	Oxidación de hidracina	Planta piloto	Minutos	La hidracina no se debe acumular. Es muy tóxica	
Físicos	Método dinámico	> 1000 mL	Minutos	Sistema sin microorganismos que simulen el caldo de fermentación. El tiempo de respuesta del electrodo es un parámetro crítico. El tiempo de aireación puede ser significativo a escalas más grandes	
	Método usando Kr	Cualquier escala	Minutos	El uso de un isótopo radiactivo puede causar algunos problemas en una aplicación industrial. Se puede aplicar a los procesos microbianos	
Biológicos	Método dinámico clásico	Cualquier escala	Minutos	Es necesaria una alta concentración de OD. Período de no aireación debe ser corto y OUR independiente de la concentración de OD. Cambios hidrodinámicos pueden perturbar el metabolismo microbiano	
	Método dinámico clásico para sistemas con OUR altos	Cualquier escala	Minutos	No es necesaria una alta concentración de OD. Aplicable a bioprocesos que presenta un elevado consumo	
	Método del balance de oxígeno en la fase gas	> 1000 mL	Minutos	A gran escala, asumir una supuesta buena mezcla entre la fase gas y la fase líquida puede no ser válido. Este método puede no ser la mejor opción en caso de biorreactores pequeños, donde la diferencia entre el Q^{ent} y el Q^{sal} puede ser muy pequeña, debido al corto tiempo de contacto. La precisión depende del analizador de oxígeno	
	Balance de materia conocida la velocidad de crecimiento en condiciones limitantes de oxígeno	Cualquier escala	Horas	Se asume un mantenimiento despreciable para las células. El rendimiento de oxígeno consumido para el crecimiento celular, Y_{XO} , debe ser conocido. Experimentalmente laborioso	

1.3. ESTRÉS HIDRODINÁMICO

Todos los cultivos llevados a cabo en un biorreactor agitado y aireado mecánicamente están sometidos a condiciones y fuerzas asociadas a la agitación y turbulencia del líquido que los contiene. Estas condiciones pueden establecer la productividad del bioproceso debido a la influencia que tiene la hidrodinámica del biorreactor en los fenómenos de transporte y en las respuestas fisiológicas de las células (Bronnenmeier y Märkl, 1982; Merchuk, 1991; Bandaipheth y Prasertsan, 2006; Garcia-Ochoa y col., 2013). Un esquema del acoplamiento de estos fenómenos se muestra en la Figura 1.6.

El estrés hidrodinámico que pueden sufrir las células, generalmente entendido como cizallamiento, esfuerzo de corte, estrés de corte o “*shear stress*” (τ), deriva de la fuerza por unidad de superficie que ejercen en forma paralela los flujos del medio de cultivo sobre la superficie de cada partícula biológica (Trujillo-Roldan y Valdez-Cruz, 2006). El valor de τ es proporcional a la diferencia de las velocidades (dv) entre las líneas de flujo del medio de cultivo superior e inferior, dividido por una distancia muy pequeña entre estas líneas de flujo (dy); siendo dv/dy el gradiente o velocidad de deformación (γ). La constante de proporcionalidad es la viscosidad (μ), que se encuentran relacionadas de acuerdo a la ley de viscosidad de Newton:

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy} = \mu\gamma \quad [1.6]$$

Esta ecuación se cumple siempre y cuando la viscosidad sea constante, no importando la velocidad de deformación a la que es sometido el fluido. Cuando la ecuación [1.6] se cumple, se dice que el fluido es Newtoniano. Sin embargo, en la mayor parte de los bioprocesos, se trabaja con medios de cultivo con comportamiento no Newtoniano, como en el caso de cultivos de alta densidad celular o de hongos filamentosos, en la producción de polisacáridos, o, en general, en cualquier cultivo donde la viscosidad cambie con la velocidad de cizalla. En estos casos la relación entre el esfuerzo de corte (τ) y la velocidad de deformación (γ) no es lineal, y los fluidos se suelen clasificar en pseudoplásticos, dilatantes, plásticos de Bingham y plásticos de Casson (Figura 1.7).

Los caldos de fermentación con comportamiento pseudoplástico o dilatante son descritos, generalmente, en términos del modelo de Ostwald-de Waele (Kawase y col., 1992a; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999; Garcia-Ochoa y col., 2000a y 2004):

$$\tau = k \left(\frac{dv}{dy} \right)^n = k\gamma^n = k \left(\frac{dv}{dy} \right)^{n-1} \cdot \left(\frac{dv}{dy} \right) = \mu_{ap}\gamma \quad [1.7]$$

donde los parámetros reológicos n y k se conocen como índice de comportamiento de flujo e índice de consistencia, respectivamente. El término $k(dv/dy)^{n-1}$ es la viscosidad aparente del fluido (μ_{ap}). Cuando $n < 1$ el fluido presenta un comportamiento pseudoplástico y la viscosidad aparente disminuye conforme aumenta la velocidad de cizalla; por el contrario por $n > 1$ la viscosidad aparente aumenta con la velocidad de cizalla y se dice que es dilatante.

En algunos caldos de fermentación, en el fluido no se produce movimiento hasta que no se aplica una tensión de valor finito. Este comportamiento plástico es comunmente descrito mediante el modelo reológico de Casson (Yagi y Yoshida, 1975; Nishikawa y col., 1981; Kawase y col., 1992a; Garcia-Ochoa y col., 2000a; Garcia-Ochoa y Gomez, 2004):

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + \mu_c^{1/2} \cdot \gamma^{1/2} \quad [1.8]$$

donde τ_0 es la tensión umbral o crítica de flujo y μ_c la viscosidad plástica definida por Casson. Una vez aplicada esta tensión y producido el movimiento del fluido, el comportamiento es análogo al pseudoplástico.

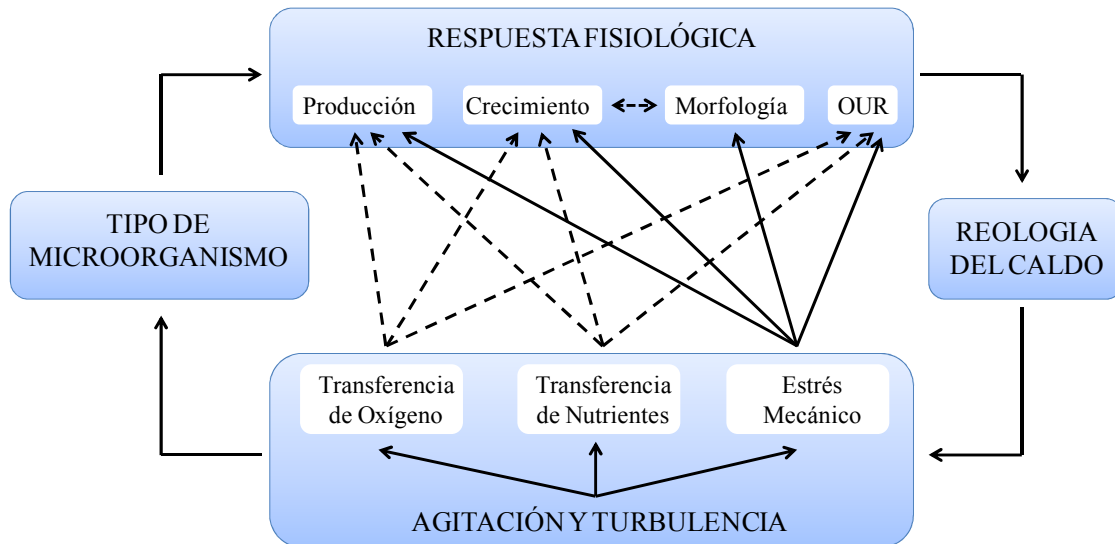


Figura 1.6 - Acoplamiento entre los fenómenos relacionados a la hidrodinámica del biorreactor y los mecanismos de respuesta de las células. Las líneas continuas y punteadas indican respectivamente, acoplamientos físicos y bioquímicos (adaptado de Olmos y col., 2013).

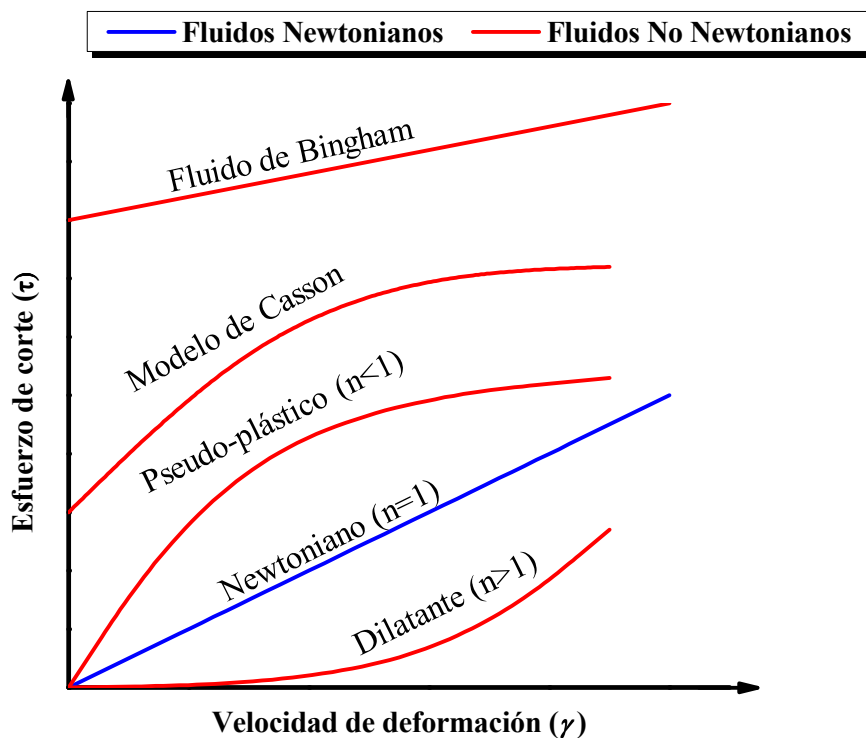


Figura 1.7 - Tipos de fluidos como función de su velocidad de deformación. (—) Fluido Newtoniano y (—) Fluidos No Newtonianos.

La deformación tangencial que pueden sufrir las células a causa del estrés hidrodinámico puede a su vez generar diferentes cambios fisiológicos, que pueden considerarse como la respuesta de las células a dicho cizallamiento (McCloskey, 2011). De esta manera, el “estrés” o daño celular se puede definir como: “*todo efecto generado sobre el microorganismo que afecta al metabolismo, crecimiento u organización celular del mismo en un sentido negativo, con respecto a una situación normal*” (Märkl y Bronnenmeier, 1985). Los efectos negativos del estrés hidrodinámico sobre las células pueden ser clasificados en daños letales y daños subletales (Figura 1.8) (Joshi y col., 1996; Henzler, 2000). Los daños letales provocan muerte celular por lisis, resultando, por tanto, en un daño irreversible para las células. Los daños subletales pueden causar daño, produciendo alteraciones en la célula sin llegar a causar la muerte; normalmente se ponen de manifiesto como un cambio metabólico de las células del cultivo y suelen ser considerados como la respuesta más habitual del estrés hidrodinámico (Märk y col., 1991; Papoutsakis, 1991). Si bien numerosos trabajos han puesto de manifiesto efectos letales en células de mamíferos (Shiragami, 1997; Al-Rubeai y Singh, 1998; Chisti, 2001; Nienow, 2006) y de plantas (Rodríguez-Monroy y Galindo, 1999 y 2003), hay poca información en la literatura científica que muestre la muerte celular de bacterias como un efecto directo de las fuerzas hidrodinámicas, aunque puede darse, como el caso que se reportó en el estudio llevado a cabo por García-Ochoa y col. (2013), en el que habiendo cultivado células de *Xanthomonas campestris* a altas velocidades de agitación (800 rpm) en un biorreactor de tanque agitado, se detectó, a través del análisis de la morfología celular por microscopía electrónica de transmisión (TEM), un importante daño en las membranas de las mismas, lo que a su vez coincidió con niveles de viabilidad celular muy bajos, de alrededor del 8 %.

Los daños subletales suelen ser los más frecuentes en los cultivos sumergidos (Kieran y col., 2000). En efecto, muchas investigaciones han mostrado daños subletales, como consecuencia de las fuerzas hidrodinámicas, no sólo en cultivos con células de plantas (Leckie y col., 1991; Meijer y col., 1994), células de animales (Chisti, 2000) y hongos filamentosos (Makagiansar y col., 1993; Chisti y Moo-Young, 1994), sino también cultivos de bacterias (Märk y Bronnenmeier, 1985; Märk y col., 1991; Hewitt y col., 1998; Henzler, 2000; Çalik y col., 2004; Stolberg y McCloskey, 2009; Wang y col., 2010; Hodaifa y col., 2011; Li y col., 2011; Olmos y col., 2013; Sun y col., 2012; García-Ochoa y col., 2013).

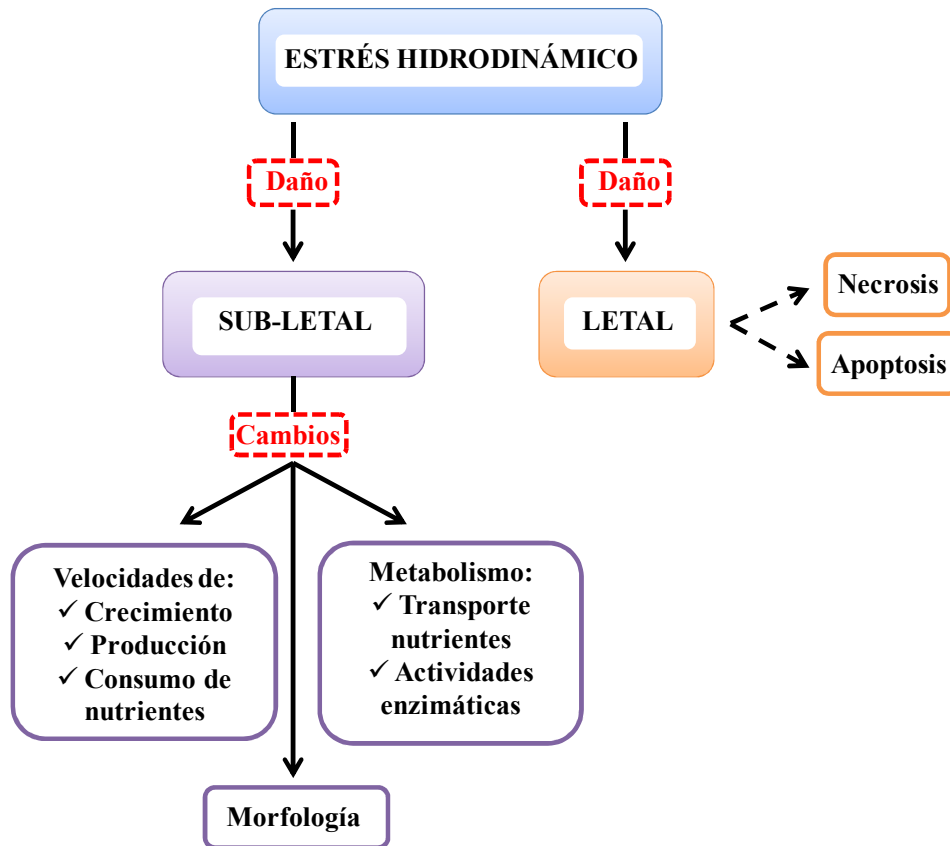


Figura 1.8 - Cambios más comúnmente citados como respuesta de las células al estrés hidrodinámico (adaptado de Trujillo-Roldan y Valdez-Cruz, 2006).

1.3.1. Mecanismos de daño celular

En la literatura científica se han propuesto distintos mecanismos de daño o, incluso, destrucción de células, principalmente cuando el crecimiento se realiza en biorreactores agitados mecánicamente. Dichos mecanismos pueden tener diferentes orígenes y pueden resumirse en los siguientes (Pohorecki y col., 2001):

1. Abrasión mecánica de las células (colisiones entre las células y las paredes del biorreactor, tabiques deflectores u otros elementos mecánicos).
2. Colisiones célula-célula.
3. Colisiones célula-agitador.
4. Interacciones célula-flujo del fluido.
5. Ruptura o coalescencia de las burbujas.

Según Cherry y Papoutsakis (1986), la primera causa de daño celular parece ser la interacción entre las células y los remolinos del régimen turbulento, determinado por la longitud de escala de Kolmogoroff; en segundo lugar, estarían las colisiones entre las células y el agitador, los tabiques deflectores y otros elementos del biorreactor; finalmente, se apunta que otra causa de daño celular pueden ser las fuerzas cortantes de la capa límite en las paredes del reactor y del agitador.

En cuanto al nivel de estrés hidrodinámico generado por la interacción entre las células o los microportadores de células y los remolinos del régimen turbulento (Figura 1.9), viene determinado por la relación de sus tamaños (Cherry y Papoutsakis, 1986; Papoutsakis, 1991a; Garcia y col., 2000; Trujillo-Roldan y Valdez-Cruz, 2006):

- Cuando el tamaño de los remolinos es mucho mayor que el de las células, éstas seguirán el flujo local y apenas existirá estrés hidrodinámico (Figura 1.9a).
- Cuando el tamaño del remolino es del mismo orden de magnitud que las células, pueden producirse distintos tipos de interacciones: un remolino simple sólo puede actuar sobre una parte de la superficie de la célula produciendo sobre ella una rotación, lo que supondría un bajo nivel de estrés hidrodinámico (Figura 1.9b). Sin embargo, puede darse un elevado nivel de esfuerzo cortante sobre las células cuando muchos remolinos, con rotación opuesta, interaccionan con ellas simultáneamente, provocando que la célula no pueda rotar (Figura 1.9c).
- Cuando el remolino es del mismo tamaño que el espacio entre células, se producen colisiones entre éstas y con el agitador, generándose un estrés dependiente de la energía de colisión y de la frecuencia de las mismas. La energía de colisiones célula-célula, E_{cc} , puede ser estimada como:

$$E_{cc} \approx \left(\rho_c \cdot \frac{\pi}{6} d_c^3 \right) \cdot u^2 \quad [1.9]$$

donde ρ_c es la densidad de la célula, d_c es el diámetro medio de la célula y u es la velocidad de fluctuación de los remolinos. Mientras la energía de colisiones célula-agitador, E_{ca} , puede ser estimada desde la velocidad periférica del agitador:

$$E_{ca} \approx \frac{1}{2} \left(\rho_c \cdot \frac{\pi}{6} d_c^3 \right) \cdot v_{tip}^2 \quad [1.10]$$

siendo v_{tip} la velocidad típica del agitador (Garcia-Ochoa y col., 2013).

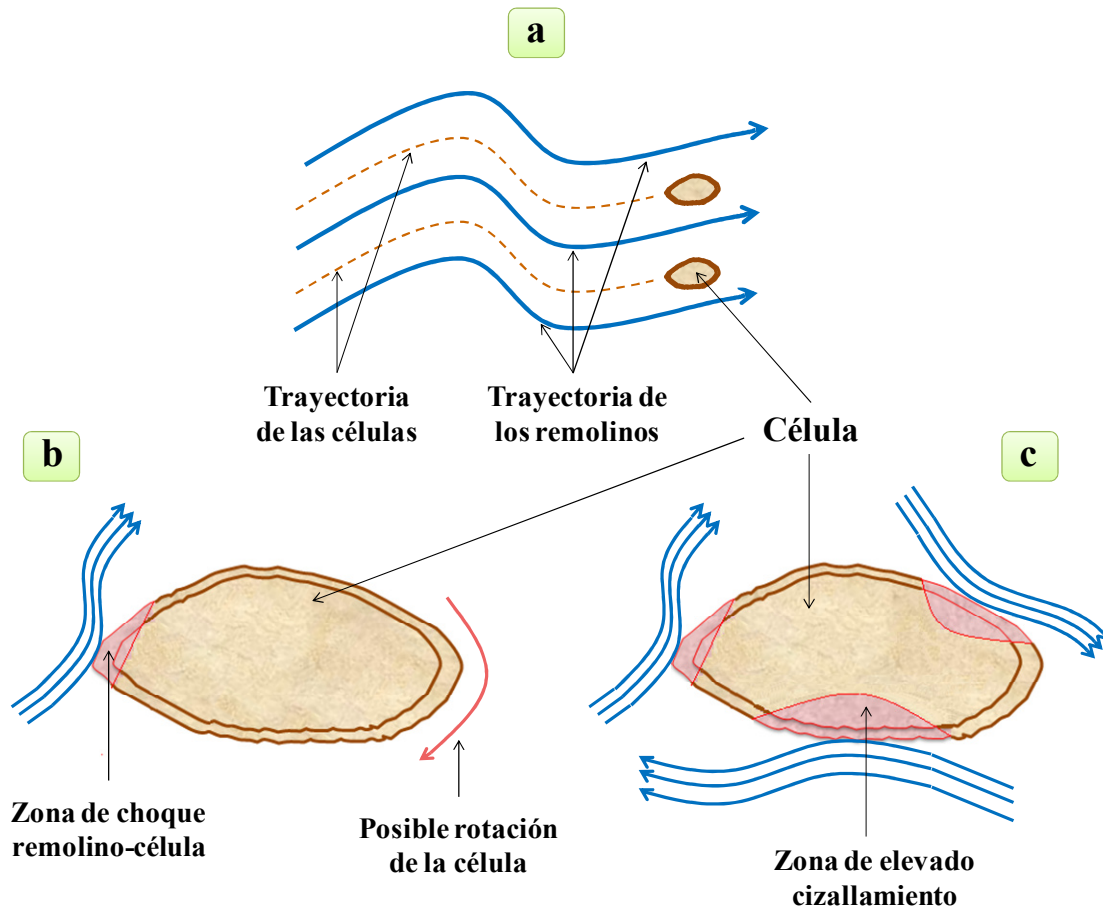


Figura 1.9 - Interacciones remolino-célula (adaptado de Doran, 2013).

Teniendo esto en cuenta, se explica que en tanques agitados a bajas **velocidades de agitación** apenas se produzca daño celular, pues el tamaño de remolino es mayor que el de las células. Sin embargo, al aumentar la velocidad de agitación aumenta el daño celular, pues el tamaño de remolino disminuye hasta hacerse más pequeño que el tamaño de las células, ejerciendo sobre éstas un estrés cortante (Merchuk, 1991; Trujillo-Roldan y Valdez-Cruz, 2006). La presencia de dispositivos internos que generan una mayor turbulencia en el fluido, con la consiguiente mejora del proceso de mezcla, como los **tabiques deflectores**, son otra variable importante a tener en cuenta. Estos dispositivos se emplean con el objetivo de mejorar la mezcla en el medio de cultivo y evitar volúmenes muertos. Por lo tanto, son elementos destacados a la hora de mejorar el transporte; sin embargo, también pueden producir efectos negativos, puesto que suponen un aumento de la abrasión que sufren las células, que, al chocar contra estos dispositivos, sufren un aumento del daño celular, haciendo disminuir la concentración máxima de biomasa o la productividad (Galindo y col., 2004).

El *caudal de aire* contribuye al estrés en mucha menor medida que la velocidad de agitación. No obstante, debe ser considerado en cultivos de células muy sensibles al estrés, ya que al aumentar el valor de dicha variable se favorece la formación y ruptura de burbujas en la superficie del líquido, dando lugar a un aumento del daño celular debido a las interacciones de las células con dichas burbujas (García-Camacho y col., 2000; Puthli y col., 2005).

En resumen, del análisis de los trabajos publicados, se puede concluir que los factores que afectan a las células, sea a su morfología, a su velocidad de crecimiento, a su productividad o, en general, a su metabolismo, son muchos y de diferente naturaleza (y en muchos casos están acoplados). Si bien, entre los más relevantes, destacan, por ser más significativos, el tipo y tamaño de célula y el tiempo de exposición al agente agresivo, por lo que se han desarrollado distintas técnicas para evaluar la sensibilidad de la células a las distintas situaciones hidrodinámicas (Sato, 2000).

1.3.2. Métodos experimentales de evaluación de la sensibilidad de las células al estrés hidrodinámico

En los primeros trabajos experimentales, para determinar el efecto de las tensiones cortantes sobre las células y así evaluar la sensibilidad de las mismas al estrés hidrodinámico, se emplearon *viscosímetros* de tubos concéntricos (Midler y Finn, 1966; Henzler, 2000). El fundamento de esta técnica experimental se basa en que, al ser muy pequeño el espacio entre los cilindros por los que se hace circular el caldo de cultivo, se puede considerar que la tensión cortante o cizallamiento a la que éste es sometido es constante. Así, el viscosímetro *Couette* permite medir, bajo condiciones de régimen laminar, la sensibilidad de las células al estrés cortante (Midler y Finn, 1966). La ventaja de este método radica en la posibilidad de poder estudiar el comportamiento o resistencia de las células bajo unas condiciones controladas de cizallamiento; sin embargo, el método sólo permite el estudio de una componente del estrés (la tensión tangencial laminar) y realizar medidas en condiciones de bajo estrés, muy alejadas de la mayoría de las situaciones reales de los bioprocesos.

Otro dispositivo utilizado, en la medida del efecto del estrés, es el **biorreactor de estrés laminar controlado** (Soule y col., 1987). Este reactor tiene un diseño muy semejante al del viscosímetro de *Couette*, estando constituido por dos cilindros concéntricos, de manera que el cilindro más externo puede rotar con una velocidad entre 0 y 80 rpm, haciendo circular el caldo de cultivo a través del espacio comprendido entre ellos. Dado que este espacio es de un espesor pequeño, se puede considerar que la componente radial de la tensión cortante a la que se encuentran sometidas las células es constante. Otros autores (Janes y col., 1987; Curran y Black, 2004) han utilizado también este dispositivo, pero modificando su funcionamiento (en lugar de girar el cilindro exterior, lo hace el interno). Utilizando un dispositivo de este tipo, Janes y col. (1987) midieron, además, la sensibilidad de las células al estrés en presencia de aireación.

Los **reactores free-jet** son otro dispositivo experimental utilizado para analizar la capacidad de resistencia de los microorganismos al estrés hidrodinámico (Merchuk, 1991; Henzler, 2000). Estos reactores son sistemas muy sencillos que se basan en hacer circular el medio de cultivo a través de una boquilla sumergida en el mismo, por el que el flujo pasa de forma controlada y cíclica (un número determinado de veces). En este caso el daño celular es debido, fundamentalmente, a dos fenómenos: por un lado, a los cambios de presión y, por otro, a la presencia de tensión cortante puntual, durante un corto espacio de tiempo (este último efecto es el más importante). Bronnenmeier y Markl (1982), utilizando este dispositivo, encontraron que los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* mostraban un comportamiento diferente como consecuencia del daño celular producido por el *jet*. Sus resultados fueron comparados con los obtenidos en un tanque agitado, donde la tensión cortante es generada por el agitador, encontrando una relación entre el estrés hidrodinámico y la energía disipada crítica en ambos sistemas.

Otra opción para realizar el estudio del estrés celular en condiciones reales y bajo un régimen turbulento es utilizar **biorreactores tipo tanque agitado**. Para ello, se somete a los cultivos a distintas velocidades de agitación y se compara su comportamiento con un sistema de bajo estrés, como el que se produce en un *Erlenmeyer* (García-Ochoa y col., 2013) o un reactor *air-lift* (Sittig y Heine, 1977). La estandarización de los experimentos es complicada debido a la enorme variedad que existe en cuanto a la geometría de los sistemas, y su dependencia del tipo de célula

cultivada. Así, Wagner y Volgemann (1977) llegaron a la conclusión de que cada microorganismo, en función del tipo del biorreactor, soportaba una velocidad de agitación diferente, pero esta afirmación resulta controvertida.

1.3.3. Indicadores de estrés hidrodinámico

Son numerosos los trabajos en la literatura que estudian la influencia de la agitación, la aireación y la concentración del oxígeno disuelto en cultivos. Sin embargo, la mayoría no separan los efectos producidos por los fenómenos de transferencia de materia (principalmente de oxígeno) de aquéllos causados por el estrés. Aunque la respuesta de las células varía dependiendo de la naturaleza y el alcance del daño, existen distintas respuestas fisiológicas que pueden ser indicadores de una situación de estrés. Algunas de ellas se comentan a continuación.

Muchos de los estudios sobre la influencia de las fuerzas mecánicas en la **morfología** se han realizado con mohos, debido a su amplia utilización en numerosos procesos industriales. Estos mohos pueden presentar dos formas, en filamentos o en *pellets*. Cuando se encuentran como *pellets*, se observa experimentalmente que la forma cambia con la velocidad de agitación. Según Taguchi y col. (1966) existen dos tipos de cambio, por un lado, se produce una disminución del diámetro y, por otro, se rompe directamente la estructura, debido a las tensiones hidrodinámicas, dando lugar a *pellets* más pequeños y compactos. En cuanto a cultivos de bacterias, se ha observado que éstas sufren una elongación en su forma, así como una disminución de tamaño, a causa de las condiciones fluidodinámicas del medio de cultivo (Albadalejo 1996; Gautam y Sharma, 2002; Sahoo y col., 2003; Garcia-Ochoa y col., 2013). Otros autores, al cultivar células vegetales en tanques agitados, también han observado que los agregados celulares se deforman como consecuencia del estrés hidrodinámico que sufren las células (Takeda y col., 1994).

Es sabido que algunos microorganismos, como mohos, bacterias y hongos, excretan **sustancias intracelulares** al caldo de cultivo cuando se encuentran sometidos a fuerzas mecánicas, por ejemplo, por una elevada velocidad de agitación. Alguno de estos componentes celulares pueden ser ácidos nucleicos de bajo peso molecular. No obstante, según Kieran y col. (1999), un aumento de la concentración de estos

componentes no es, necesariamente, indicativo de lisis celular, sino que puede deberse a la secreción de sustancias intracelulares.

En cuanto a **cambios metabólicos** como consecuencia del estrés hidrodinámico, se ha observado una disminución en el contenido de ATP en las células. Esta disminución es más rápida cuanto mayor es la velocidad de agitación (Takeda y col., 1994). En otros casos, el cambio metabólico se ha puesto de manifiesto mediante una pérdida de actividad enzimática de hasta el 40 %, a causa de una elevada velocidad de agitación, como consecuencia de una combinación entre lisis celular y ruptura de los agregados (Arrojo y col., 2006), o a consecuencia de una ruptura de las hifas que constituyen los hongos (Large y col., 1998).

La **viabilidad celular** o proporción de células que mantienen la capacidad de reproducirse después de alguna situación particular, es uno de los indicadores de estrés más utilizados (Hewitt y col., 1998; Boswell y col., 2003). Este hecho implica la presencia de actividad metabólica e integridad de la membrana. La existencia de células dañadas o inactivas (viables pero no cultivables), que no están disponibles para crecimiento de cultivo, no detectadas mediante los métodos de análisis tradicionales, suponen una deficiencia adicional en la caracterización del microorganismo en un bioproceso. Son múltiples los factores estresantes que inducen a las células a adoptar un estado de no cultivables para soportar el estrés y sobrevivir. En este estado, el microorganismo pierde su capacidad de reproducción, pero exhibe actividad metabólica en varios grados, según la especie y el tipo de estrés (Díaz y col., 2010).

Finalmente, varios autores (Palomares y Ramírez, 1996; Çalik y col., 2004; Zou y col., 2009), sugieren que las **velocidades de crecimiento, producción y consumo de nutrientes**, por su facilidad de medida durante el cultivo, son los indicadores adecuados para evaluar el estrés hidrodinámico.

En un trabajo reciente, Garcia-Ochoa y col. (2013) han realizado un análisis teórico que permite establecer los distintos tipos de limitaciones en el desarrollo de un bioproceso aerobio, debido a los efectos que puede ejercer la hidrodinámica del biorreactor sobre las células, a través de la influencia de la velocidad de agitación en el factor de efectividad para el crecimiento, η (Figura 1.10). Una de ellas está directamente relacionada con la mezcla y la transferencia de materia, debido a que los sustratos contenidos en el medio de cultivo deben ser homogéneamente distribuidos por el

biorreactor y tener una concentración adecuada para satisfacer las necesidades nutricionales (por ejemplo, que no se llegue a satisfacer la OUR demandada por las células por existir una baja OTR). En este caso, las velocidades de crecimiento y de producción pueden ser afectadas por la hidrodinámica del sistema debido a condiciones limitantes de oxígeno (zona a). Cuando la agitación es incrementada, se alcanza una situación donde la mezcla y el transporte de materia proporcionan unas condiciones adecuadas para el crecimiento y, por tanto, la velocidad del proceso estará determinada por el metabolismo de las células. Bajo esta situación, se alcanzaría la máxima velocidad de crecimiento (zona b). Sin embargo, en algunos cultivos celulares o dentro de determinadas condiciones de operación, al exceder cierto nivel de agitación, las fuerzas que se generan en el interior del biorreactor (principalmente, de cizalla) pueden llegar a afectar a las células y la velocidad global del proceso disminuiría (zona c en la Figura 1.10A). Esta misma situación también podría darse incluso antes de que se alcance el máximo comentado (zona c en la Figura 1.10B). La aplicación de este modelo fue comprobada con éxito en la producción de xantano por la bacteria *X. campestris* bajo diferentes niveles de esfuerzo cortante (*shear stress*) en matraz *Erlenmeyer* y en un biorreactor tipo tanque agitado (García-Ochoa y col., 2013).

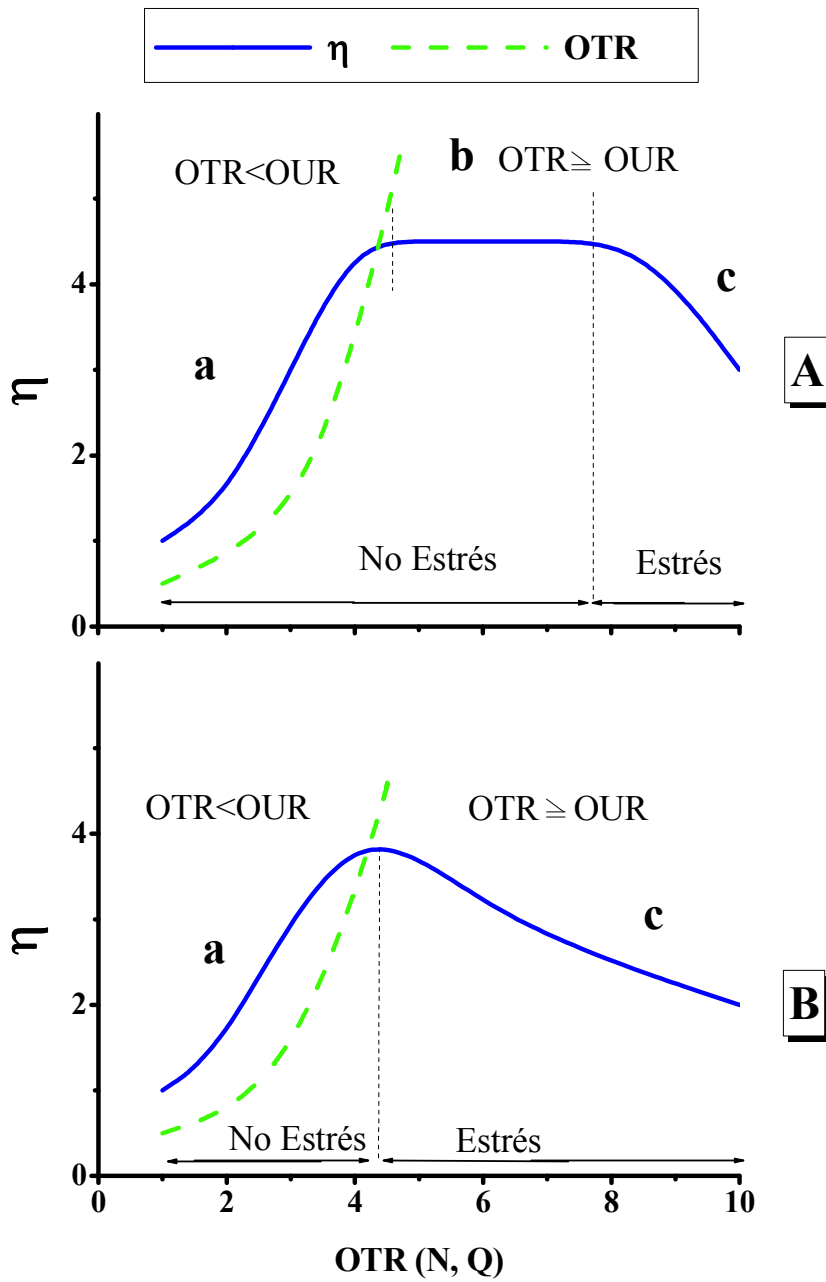


Figura 1.10 – Variación teórica del factor de efectividad para el crecimiento, η , con OTR (adaptado de Garcia-Ochoa y col., 2013).

1.4. BIODESULFURACIÓN de DBT

Las bacterias que se emplean en este trabajo para estudiar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el crecimiento de la biomasa y la producción de metabolitos son bacterias capaces de llevar a cabo el proceso denominado biodesulfuración. Una de ellas es natural (*Rhodococcus erythropolis* IGTS8), otra es un organismo modificado genéticamente (*Pseudomonas putida* KTH2 (pESOX3), que de aquí en adelante se nombrará como *Pseudomonas putida* KTH2).

La biodesulfuración (BDS) consiste en el empleo de microorganismos vivos o partes de ellos para la eliminación del azufre, aplicando las técnicas desarrolladas por la biotecnología (Le Borge y Quintero, 2003; Gupta y col., 2005). Surge como una tecnología alternativa y/o complementaria a la hidrodesulfuración (HDS) convencional para la eliminación de azufre en combustibles fósiles (Ohshiro e Izumi, 1999). En general, en los estudios de BDS se ha empleado una molécula modelo, el dibenzotiofeno (DBT), compuesto que también fue usado en el desarrollo de catalizadores convencionales para la HDS, y que es representativo de las moléculas más recalcitrantes en las fracciones tipo gasóleo del petróleo (Setti y col., 1997; McFarland, 1999; Stanislaus y col., 2010).

La BDS de petróleo y fracciones petrolíferas se empezó a investigar a mediados del siglo XX. Las primeras patentes fueron publicadas a comienzos de la década de los cincuenta (ZoBell, 1953), aunque los procesos nunca llegaron a funcionar. Los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en este campo empezaron a tomar relevancia en los años 90, con dos hechos significativos: el aumento en la preocupación por la contaminación por azufre y el descubrimiento de un nuevo microorganismo, *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 que degrada DBT a HBP, molécula libre de azufre, a través de una ruta no destructiva denominada 4S, sin afectar a la estructura carbonada (Kilbane, 1990). Estos dos hitos hicieron que, a partir de los años 90, el estudio del proceso de biodesulfuración recibiera mucha atención y experimentara un gran desarrollo.

Existen varias *rutas metabólicas* mediante las cuales los microorganismos son capaces de eliminar compuestos azufrados, como el dibenzotiofeno y sus derivados (Gupta y col., 2005). De todas ellas, la más interesante y estudiada es la ya citada ruta 4S. Se trata de una ruta aerobia y selectiva no destructiva, que degrada el DBT a

hidroxibifenilo (HBP) a través de cuatro reacciones consecutivas (Kilbane, 2006). En la Figura 1.11 se muestra un esquema de la ruta 4S, en la que se describe cómo ocurre la eliminación selectiva del átomo de azufre después de cuatro reacciones en serie:

- La *primera reacción* de la ruta 4S está catalizada por la monooxigenasa DszC. Es una proteína tetramérica de 180 kDa (Gray y col., 1996). Esta reacción consiste en la oxidación de DBT a dibenzotiofeno-5-óxido (DBT-sulfóxido o DBTO), invirtiendo, por cada molécula de DBT oxidada, un átomo de oxígeno, que se une al azufre del compuesto de partida, y liberando una molécula de H₂O y otra de FMN (Oldfield y col., 1997).
- En la *segunda reacción*, tiene lugar la oxidación de dibenzotiofeno-5-óxido hasta dibenzotiofeno-5,5-dióxido (DBT-sulfona o DBTO₂) por la acción de la misma enzima anterior, DszC. El consumo de oxígeno y de mononucleótido de flavina reducido y la producción de H₂O y FMN son análogos a los de la etapa anterior.
- La *tercera reacción* consiste en la apertura del anillo tiofénico por la adición de un tercer átomo de oxígeno. En este caso, la monooxigenasa DszA cataliza la transformación del DBTO₂ en 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato (abreviado HBPS), con inversión de dos moléculas de FMNH₂ por cada molécula de DBTO₂. La enzima DszA es una proteína dimérica de 100 kDa (Gray y col., 1996; Ohshiro y col., 1999).

Este ciclo de tres reacciones es catalizado por la enzima FMN-NADPH oxidorreductasa, denominada DszD, que es una proteína de 20 kDa, que proporciona FMNH₂ a las enzimas DszA y DszC (Xi y col., 1997; Gray y col., 1996).

- Finalmente, en la *cuarta reacción*, se libera una molécula de SO₃²⁻ y queda libre una molécula de 2-hidroxibifenilo (HBP) por cada molécula de DBT de partida. Esta última etapa está catalizada por la enzima desulfinasas DszB, una proteína monomérica de 40 kDa (Denome y col., 1994; Gray y col., 1996), que rompe el enlace C-S entre el grupo fenilo y el grupo ácido sulfínico (Oldfield y col., 1997).

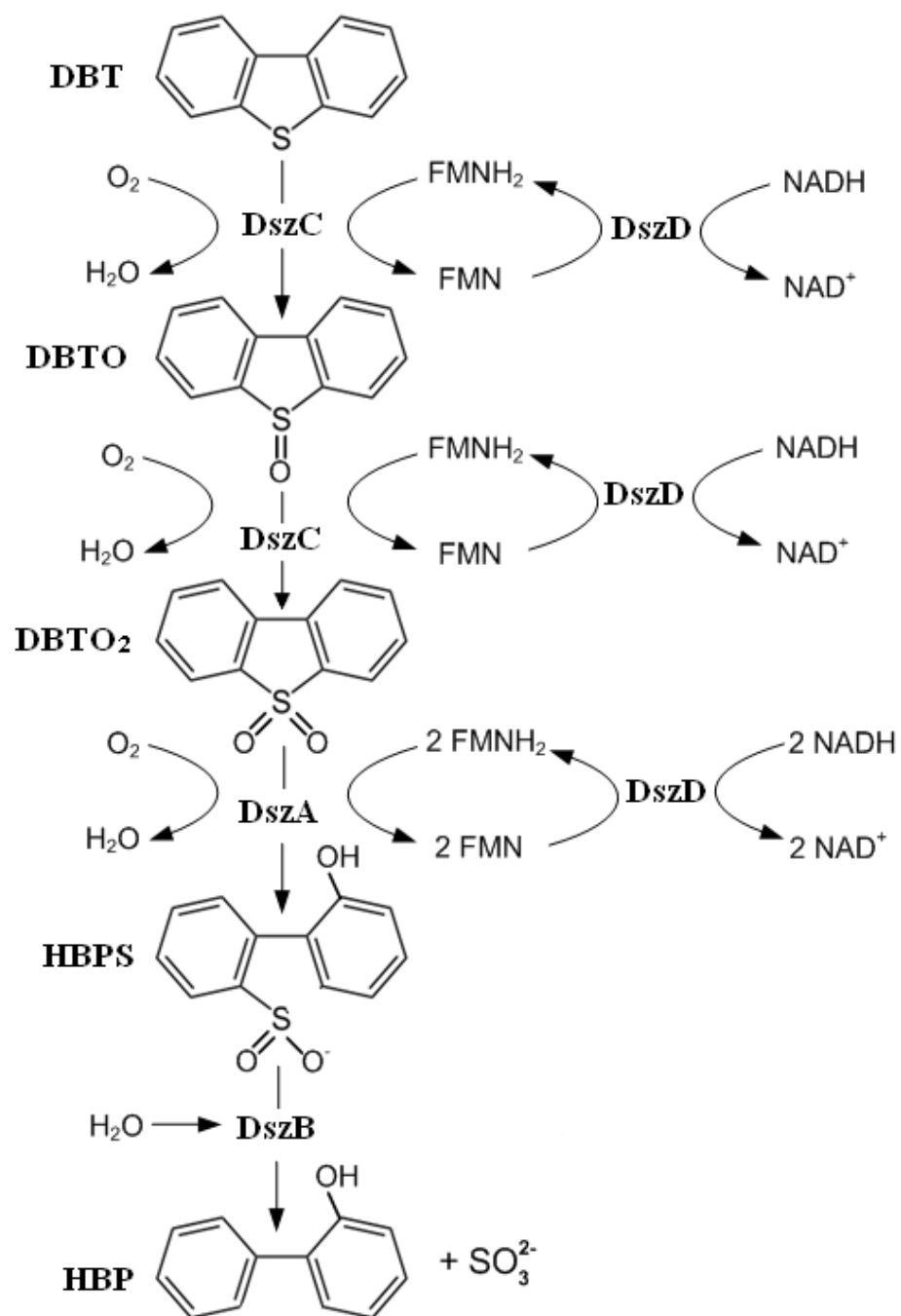


Figura 1.11 - Esquema de la Ruta 4S de desulfuración de DBT por primera vez llevada a cabo por *Rhodococcus erythropolis* IGTS8.

Son muchos los *microorganismos con capacidad desulfurante* y empleados en trabajos de biodesulfuración. En la Tabla 1.2 se recogen algunos de los más importantes.

El empleo de las herramientas de Ingeniería Genética ha permitido desarrollar microorganismos modificados genéticamente (GMO), a fin de obtener biocatalizadores con mejores características para llevar a cabo el proceso de BDS. La expresión de la oxidorreductasa procedente de *Vibrio harveyi* en *E. coli* logró mejorar la capacidad de desulfuración de esta bacteria (Reichmuth y col., 2000). Asimismo, se ha mejorado la actividad desulfurante mediante la aplicación de técnicas de Ingeniería Genética en *R. erythropolis* KA2-5-1 (Hirasawa y col., 2001). Además de mejoras en bacterias del género *Rhodococcus* y en microorganismos mesófilos, se ha propuesto el empleo de bacterias recombinantes del género *Pseudomonas* por su tolerancia a disolventes orgánicos para desulfurar compuestos modelo, como DBT (Galan y col., 2000; Le Borge y Quintero, 2003).

Tabla 1.2 - Principales microorganismos empleados en biodesulfuración.

Microorganismo	Referencia
<i>Agrobacterium sp.</i> MC501	Constanti y col., 1994
<i>Arthrobacter sp.</i> ECRD-1	Lee y col., 1995
<i>Bacillus subtilis</i> WU-S2B	Kirimura y col., 2001)
<i>Corynebacterium sp.</i> ZD-1	Wang y col., 2006
<i>Enterobacter sp.</i>	Lakshmanraj y col., 2012
<i>Gordonia alkanivorans</i> 1B	Alves y col., 2008
<i>Gordonia alkanivorans</i> RPI90A	Shavandi y col., 2009
<i>Klebsiella sp.</i>	Dudley y Frost, 1994
<i>Mycobacterium goodii</i> X7B	Li y col., 2007 ^a
<i>Mycobacterium phlei</i> SM120-1	Srinivasaraghavan y col., 2006
<i>Pseudomonas putida</i> DS23	Tao y col., 2011
<i>Pseudomonas delafieldii</i> R-8	Luo y col., 2003
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279	Martin y col., 2004; Calzada y col., 2009
<i>Rhodococcus erythropolis</i> D-1	Izumi y col., 1994
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8	Kilbane y Jackowski, 1992; Olmo y col., 2005
<i>Rhodococcus sp.</i> P32C1	Maghsoudi y col., 2001
<i>Sphingomonas subarctica</i> T7b	Gunam y col., 2006

Las **formas de operación** para llevar a cabo el proceso de biodesulfuración son variadas. En cuanto al estado del biocatalizador, se puede trabajar tanto con células completas como con enzimas libres. En el caso de utilizar células completas, pueden emplearse tanto en crecimiento como en estado de células en reposo o *resting cells*.

El empleo de *enzimas libres* evita problemas de difusión de reactivos y productos a través de la membrana celular (Ohshiro y col., 1994). Sin embargo, la actividad de las enzimas libres es menor que en células completas debido a que éstas últimas poseen mecanismos para regenerar los cofactores y el poder reductor que necesitan las enzimas. Además, la extracción y purificación de estas enzimas es un proceso costoso que puede hacer económicamente inviable el proceso (Setti y col., 1997; Soleimani y col., 2007).

Otra forma de operación es el empleo de *células completas* como biocatalizadores, que es más ventajoso que el empleo de enzimas libres. Utilizar células que mantienen la integridad de su membrana y su organización interna permite mantener las condiciones óptimas a las que trabajan sus enzimas, sin necesidad de aportar determinados compuestos muy lábiles (cofactores, coenzimas, entre otros) (Setti y col., 1997). Las condiciones de trabajo con células completas dependen de si existe o no duplicación celular. Pueden utilizarse *células en crecimiento* o *células en estado de resting cells*. Muchos autores han reflejado en la literatura las ventajas de biodesulfurar durante el crecimiento, sobre todo por poder mantener la actividad de las células de forma más prolongada (Soleimani y col., 2007; Yang y col., 2007). Sin embargo, las operaciones en crecimiento presentan como inconvenientes la menor velocidad del proceso y los menores rendimientos que se consiguen (Soleimani y col., 2007), así como la posible inhibición del biocatalizador, causada por el producto final de la ruta (Nekodzuka y col., 1997). Por estos motivos, y por las dificultades que presentan muchos microorganismos para crecer en sistemas bifásicos, muchos investigadores eligen trabajar con células en condiciones de *resting cells* (Abbad-Andaloussi y col., 2003; Alcon y col., 2005; Raheb y col., 2010; Shavandi y col., 2009; Rath y col., 2012). En condiciones de *resting cells*, se trabaja con células que han desarrollado su capacidad desulfurante en una etapa previa de crecimiento controlado. Estas células se añaden al medio de desulfuración tamponado en el que se han eliminado los nutrientes básicos para impedir la duplicación (Nuhu, 2012). La separación entre las etapas de crecimiento y de desulfuración permite operar de manera más eficiente y sencilla

(Ohshiro y col., 1996), sin interferencias ocasionadas por subproductos (Konishi y col., 1997) y con altas concentraciones de biomasa (Soleimani y col., 2007). Las ventajas de trabajar “en *resting cells*” en lugar de “en crecimiento” ha sido puesta de manifiesto claramente en trabajos anteriores (Calzada, 2010, Martínez, 2013).

1.5. OBJETO y ALCANCE DEL TRABAJO

El objeto del presente trabajo es estudiar la influencia de las condiciones fluido-dinámicas en cultivos de bacterias bajo diferentes condiciones de operación en un biorreactor de tipo tanque agitado y aireado. Los microorganismos que se van a emplear para llevar a cabo dicho trabajo experimental pertenecen al género *Rhodococcus* y *Pseudomonas*, ampliamente estudiados en las investigaciones sobre sistemas de biodesulfuración llevados a cabo en el grupo de investigación Fisicoquímica de Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA), del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid.

Para ello, en primer lugar, se va a estudiar el crecimiento de ambos microorganismos, cultivando las células bajo distintas condiciones de operación, modificando la velocidad de agitación y el caudal de aire. Durante esta primera etapa, se tratará de evaluar cómo evolucionan diferentes variables, representativas del crecimiento de las células, con el objetivo de determinar si los cambios macroscópicos que se puedan observar son debidos a fenómenos de transferencia de materia (transporte gas-líquido del oxígeno) o a efectos asociados con el estrés hidrodinámico, definido éste, en general, como un cambio en el metabolismo, tanto en el crecimiento como en la capacidad desulfurante (acumulación y actividad de enzimas intracelulares) de las citadas bacterias (*Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Pseudomonas putida* KTH2).

Para el caso de *R. erythropolis* se tratará de evaluar cómo evoluciona la biomasa, el oxígeno disuelto y el consumo de oxígeno, empleando para la medida de este último el método dinámico clásico (Gomez y col., 2006). Para el caso de *P. putida*, se llevarán a cabo estudios tanto con una cepa modificada genéticamente (*P. putida* KTH2), como con la cepa salvaje (*P. putida* natural). En ambos casos, se tratará de evaluar cómo evoluciona la biomasa, el oxígeno disuelto, el consumo de la fuente de carbono, el pH y el consumo de oxígeno. A su vez, se tratará de proponer modelos cinéticos sencillos

para el crecimiento de ambos tipos de microorganismos, que puedan describir satisfactoriamente los resultados experimentales obtenidos en el crecimiento y el consumo de oxígeno, y comprobar si los valores de los parámetros cinéticos reflejan la situación del cultivo; es decir, si dichos valores informan sobre el posible control del fenómeno de transferencia o del posible estrés (hidrodinámico u oxidativo), que afecten a las células, y bajo qué condiciones fluidodinámicas se dan estas circunstancias.

Como se ha comentado en apartados anteriores, no se han propuesto métodos rápidos y fiables para determinar las situaciones citadas en el párrafo anterior, control difusional (velocidad de transporte de oxígeno como etapa más lenta), control químico (velocidad del proceso global determinada por la velocidad de la red de reacciones que forman el metabolismo del microorganismo) o estrés hidrodinámico (efecto de las condiciones hidrodinámicas o de la elevada concentración de oxígeno en el líquido sobre el metabolismo celular). En este trabajo, uno de los objetivos es desarrollar un método rápido para determinar condiciones de estrés para un bioproceso aerobio.

En una segunda etapa de la investigación, se estudiará la influencia de las condiciones hidrodinámicas que se establezcan en el biorreactor durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 y de *P. putida* KTH2 sobre su metabolismo, en cuanto a la capacidad desulfurante acumulada por las células durante su crecimiento. Para ello, se obtendrán células de diferentes edades, tanto de *R. erythropolis* IGTS8 como *P. putida* KTH2, cultivadas bajo diferentes condiciones de operación (modificando la velocidad de agitación), y, posteriormente, se analizará la capacidad desulfurante que han desarrollado las mismas a través de un ensayo de BDS en *resting cells*.

Finalmente, se tratará de profundizar en los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad desulfurante, planteando un estudio experimental para analizar cómo cambian las actividades de las enzimas DszC, DszA y DszB, encargadas de catalizar las etapas de la ruta 4S de biodesulfuración, determinando cuál de ellas puede ser la más sensible a verse influenciada por los cambios metabólicos que reproduce *P. putida* KTH2 cuando son modificadas las condiciones hidrodinámicas durante su crecimiento.

1.6. BIBLIOGRAFIA

Abbad-Andaloussi, S.; Warzywoda, M. y Monot, F., 2003. Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains. *Oil & Gas Science and Technology-Revue de Institut Francais du Petrole.* **58**, 505-513.

Albadalejo, J., 1996. Stress hidrodinámico en cultivos *Xantomonas campestris*. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Alcon, A.; Santos, V.E.; Martin, A.B.; Yustos, P. y Garcia-Ochoa, F. 2005. Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* **26**, 168-175.

Alves, L.; Marques, S.; Matos, J.; Tenreiro, R. y Girio, F.M., 2008. Dibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using recycled paper sludge hydrolyzate. *Chemosphere.* **70**, 967-973.

Al-Rubeai, M. y Singh, R.P., 1998. Apoptosis in cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 152-156.

Arrojo, B.; Mosquera-Corral, A.; Campos, J.L. y Mendez, R., 2006. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *J. Biotechnol.* **23**, 453-463.

Bandaipheth, C. y Prasertsan, P., 2006. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydr. Polym.* **66**, 216-228.

BBD: Biocatalyst Biodegradation Database, **2007.** Universidad de Minnesota. <http://umbbd.msi.umn.edu>.

Belmar-Beiny, M.T. y Thomas C.R., 1991. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 456-62.

Bennet, C.O. y Myers, J.E., 1962. Momentum, heat and mass transfer. McGraw Hill. 15-23.

Blanch, H.W. y **Clark** D.S., **1997**. Transport process in biochemical engineering. Ed. Marcel Dekker. New York.

Bourne, J.R.; Zurita, E.P. y Heinzle, E., **1992**. Bioreactor scale-up for the oxygen-sensitive culture *Bacillus subtilis*: The influence of stirrer shaft geometry. *Biotechnol. Prog.* **8**, 580-582.

Boswell, C.D.; Nienow, A.W.; Gill, K.; Kocharunchitt S., y Hewitt, C.J., **2003**. The impact of fluid mechanical stress on *Saccharomyces cerevisiae* cells during continuous cultivation in an agitated, aerated bioreactor; Its implication for mixing in the brewing Process and aerobic fermentations. *Trans. Inst. Chem. Engrs.* **81**, Part C, 23-32.

Bronnenmeier, R. y **Märkl**, H., **1982**. Hydrodynamic stress capacity of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 553-578.

Çalik, G.; Vural, H. y Özdamar, T.H., **1997**. Bioprocess parameters and oxygen transfer effects in the growth of naturalh *Pseudomonas dacunhae* for L-alanine production. *Chem. Eng. J.* **65**, 109–116.

Çalik, P.; Yilgör P.; Ayhan P. y Demir A.S., **2004**. Oxygen effects on benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5075-5083.

Calzada, J., **2010**. Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT5279: formas de operación. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A.; Santos, V.E.; Diaz E.; Garcia J. y Garcia-Ochoa F., **2009a**. Analysis of Dibenzothiophene Desulfurization in a Recombinant *Pseudomonas putida* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 875-877.

Calzada, J.; Heras, S.; Alcon, A.; Santos, V.E. y Garcia-Ochoa F., **2009b**. Biodesulfurization of Dibenzothiophene (DBT) Using *Pseudomonas putida* CECT 5279: A Biocatalyst Formulation Comparison. *Energy Fuels.* **23**, 5491-5495.

Cherry, R.S. y **Papoutsakis**, E.T., **1986**. Hydrodynamic effects of cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess. Eng.* **1**, 29-41.

Chisti, Y. y **Moo-Young**, M. **1994**. Slurry bioreactor design for shear-sensitive mycoprotein production. *Adv. Biop. Eng.* **14**, 25-28.

- Chisti, Y., 2000.** Hydrodynamic damage to animal cells. *Trends. Biotech.* **18**, 420-432.
- Chisti, Y., 2001.** Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit. Rev. Biotech.* **21**, 67-110.
- Coley, N.G. y Wilmot, S.A.H., 2000.** Chemical industry and the quality of life. In: Russell, C.A. (Ed.), *Chemistry Society and Environment. A New History of the British Chemical Industry.* Royal Society of Chemistry, Cambridge. **23**, 319–349.
- Constanti, M.; Bordons, A. y Giralt, J., 1994.** Degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida*. *LAM.* **18**, 107-111.
- Curran, S.J. y Black, R.A., 2004.** Quantitative experimental study of shear stress and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5859-5868.
- Denome, S.A.; Oldfield, C.; Nash, L.J. y Young, K., 1994.** Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. *J. Bacteriol.* **176**, 6707-6716.
- Deshpande, R.R. y Heinzle E., 2004.** On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol. Lett.* **26**, 763-767.
- Diaz, M., 2012.** Ingeniería de bioprocesos. Ed. Paraninfo. Madrid, 560.
- Doran, M.P., 2013.** Bioprocess Engineering principles. Academic Press Ltd. San Diego, 430.
- Dudley, M.W. y Frost, J.W., 1994.** Biocatalytic desulfurization of arylsulfonates, *Bioorg. Med. Chem.* **2**, 681-690.
- Escobar, S.; Gomez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa F., 2012.** Hydrodynamic stress effect on *Pseudomonas putida* CECT5279 growth and desulfurization capability: initial results. ANQUE- ICCE. Junio 24-27, Sevilla/España.
- Figueiredo, L.M. y Calderbank, P.H., 1979.** The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chem. Eng. Sci.* **34**, 1333-1338.
- Galan, B.; Diaz, E. y Garcia, J., 2000.** Enhancing desulfurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.* **2**, 687-694.

Galindo, E.; Flores, C.; Larralde-Corona, P.; Corkidi-Blanco, G.; Rocha-Valdez, J. A. y Serrano-Carreón, L., **2004**. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem. Eng. J.* **18**, 1-8.

Galindo, E. y **Herrera, R.**, **1989**. Effects of different impeller combinations and agitation speeds on the culture of a highly oxygen-sensitive bacteria. *Chem. Eng. J.* **42**, B9-B14.

Ganesh, R.; Balaji, G. y Ramanujam, R.A., **2006**. Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor-Respirometric assessment. *Bioresour. Technol.* **97**, 1815–1821.

García-Camacho, F.; Contreras Gómez, A.; Mazzuca Sobczuk, T. y Molina Grima, E., **2000**. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process. Biochem.* **35**, 1045-1050.

García, F.; Contreras, A.; Mazzuca, T. y Molina, E., **2000**. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process. Biochem.* **35**, 1045-1050.

García-Ochoa, F. y **Gómez, E.**, **1998**. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochem. Eng. J.* **1**, 1-10.

García-Ochoa, F. y **Gómez, E.**, **2004**. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 2489-2501.

García-Ochoa, F. y **Gómez, E.**, **2005**. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 771-772.

García-Ochoa, F. y **Gómez, E.**, **2009**. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview, *Biotechnol. Adv.* **27**, 153-176.

García-Ochoa, F. y **Gómez, E.**, **2010**. Oxygen transfer rate determination: chemical, physical and biological methods. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Wiley, New York. 1-21.

García-Ochoa, F.; Gómez, E.; Santos, V.E. **2000a**. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 680-690.

Garcia-Ochoa, F.; Santos V.; Casas J. y Gomez E., **2000b**. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* **18**, 549-579.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez E.; Santos, V.E. y Merchuk, J.C, **2010**. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* **49**, 289-307.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V.E., **2013**. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 911-925

Garcia-Serna, J.; Perez-Barrigon, L. y Cocero, M.J., **2007**. New trends for design towards sustainability in chemical engineering: green engineering. *Chem. Eng. J.* **13**, 7-30.

Gautam, S. y Sharma, A., 2002. Involvement of caspase-3-likeprotein in rapid cell death of *Xanthomonas*. *Mol. Microbiol.* **44**, 393-401.

Gomez, E., 1995. Transferencia de oxígeno en biorreactores tipo tanque agitado: Aplicación a la producción de xantano. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., **2006**. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.

Gray, K.A.; Pogrebinsky, O.S.; Mrachko, G.T.; Xi, L.; Monticello, D.J. y Squires, D. J., **1996**. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1705-1709.

Gunam, I.B.W.; Yaku, Y.; Hirano, M.; Yamamura, K.; Tomita, F.; Sone, T. y Asano, K., **2006**. Bidesulfurization of alkylated forms of dibenzothiophene and benzothiophene by *Sphingomonas subarctica* T7b, *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 322-327.

Gupta, N.; Roychoudhury, P.K. y Deb, J.K., **2005**. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 356-366.

Hall, G. y Howe, J., 2010. Sustainability of the chemical manufacturing industry- Towards a new paradigm?. *Edu. Chem. Eng.* **5**, 100-107.

Henzler, H.J., **2000**. Particle stress in bioreactors. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **34**, 35-82.

Herbst, H.; Shumpe, A. y Deckwer, W.D., **1992**. Xanthan production in stirred tank fermenters: oxygen transfer and scale-up. *Chem. Eng. Technol.* **15**, 425-434.

Hewitt, C.J.; Boon, L.A.; McFarlane, C.M. y Nienow, A.W., **1998**. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 525-656.

Hirasawa, K.; Ishii, Y.; Kobayashi, M.; Kozumi, K. y Maruhashi, K., **2001**. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 239-246.

Hodaifa, G.; Martinez, M.E.; Orpezc, R. y Sanchez, S. **2010**. Influence of hydrodynamic stress in the growth of *Scenedesmus obliquus* using a culture medium based on olive-mill wastewater. *Chem. Eng. Process.* **49**, 1161–1168.

Iglesias, E., **2005**. Estudio de la ruta 4S de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Modelo cinético. Proyecto de investigación del título de Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Izumi, Y.; Oshiro, T.; Ogino, H.; Hine, Y. y Shimao, H., **1994**. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 223-226.

Janes, D.A.; Thomas, N.H. y Callow, J.A., **1987**. Demonstration of a bubble-free annular vortex membrane bioreactor for batch culture of red beet cells. *Biotechnol. Techn.* **1**, 257-262.

Joshi, J.B.; Elias, C. y Patole, M., **1996**. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem. Eng. J.* **62**, 121-141.

Kamen, A.A.; Bedard, C.; Tom, R.; Perret S. y Jardin, B., **1996**. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 36-48.

Kawase, Y.; Halard B. Y Moo-Young, M. 1987. Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. Sci.* **42**, 1609-1617.

Kawase, Y.; Halard, B. y Moo-Young, M. 1992a. Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 1133-40.

Kawase, Y.; Umeno, S. y Kumagai, T., 1992b. The prediction of gas hold-up in bubbles column reactors: Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* **50**, 1-7.

Kawase, Y. y Hashiguchi, N., 1996. Gas-liquid mass transfer in external-loop airlift columns with Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* **62**, 35-42.

Kaya-Çeliker, H.; Angardi, V. y Çalık, P., 2009. Regulatory effects of oxygen transfer on overexpression of recombinant protein by *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnol. J.* **4**, 1066-1076.

Kieran, P.M.; Malone, D.M. y MacLoughlin P.F., 2000. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **67**, 139-177.

Kilbane, II, J.J., 1990. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources Conserv. Recycling.* **3**, 69-79.

Kilbane, II, J.J. y Jackowski, K., 1992. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1107-1114.

Kilbane, II, J.J., 2006. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 305-314.

Kirimura, K.; Furuya, T.; Nishii, Y.; Ishii, Y.; Kino, K. y Usami, S., 2001. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 262-266.

Konig, B.; Seewald, Ch. y Schugerl, K. 1981. Process engineering investigations of penicillin production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 205-211.

Konishi, J.; Ishii, Y.; Onaka, T.; Okumura, K. y Suzuki, M., **1997**. Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3164-3169.

Lakshmanraj, L.; Ganesh, V. y Chandiran., **2012**. Desulfurization of diesel by *Pseudomonas* species isolated from Indian refineries sites and optimization of process parameters by factorial design. *Hitek. J. Biosci. Bioeng.* **1**, 1-21.

Large, K. P.; Ison, A. P. y Williams, D. J., **1998**. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* **63**, 111-119.

Le Borge, S. y **Quintero, R.**, **2003**. Review Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Process. Technol.* **81**, 155-169.

Leckie, F.; Scragg, A. H. y Cliffe, K. C., **1991**. An investigation into the role of initial k_{1a} on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 364-370.

Lee, M.K.; Senius, J.D. y Grossman, M.J., **1995**. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogos of dibenzothiophene, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4362-4366.

Li, Y.G.; Ma, J.; Zhang, Q.Q.; Wang, C.S. y Chen, Q., **2007**. Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus erythropolis* NCC-1. *Chin. J. Organic. Chem.* **25**, 400-405.

Li, H.; Xu, H.; Li, S.; Feng, X.; Xu, H. y Ouyang, P., **2011**. Effects of dissolved oxygen and shear stress on the synthesis and molecular weight of welan gum produced from *Alcaligenes sp.* CGMCC2428. *Process. Biochem.* **46**, 1172-1178

Luo, M.F.; Xing, J.M.; Gou, Z.X.; Li, S. y Liu, H.Z., **2003**. Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. *Biochem. Eng. J.* **13**, 1-6.

Maghsoudi, S.; Kheirloom, A.; Vossoughi, M.; Tanaka, E. y Katoh, S., **2000**. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium sp.* strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* **5**, 11-16.

Makagiansar, H.Y.; Anyazi Shamlou, P.; Thomas, C.R. y Lilly, M.D., **1993**. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess. Eng.* **9**, 83-90.

Märk, H. y **Bronnenmeier**, R., **1985**. Mechanical stress and microbial production. In Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology*. Verlagsgesellschaft, Weinheim. **2**, 369-392.

Märk, H.; Bronnenmeier, R. y Wittek, B., **1991**. The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. *Int. Chem. Eng.* **31**, 185-197.

Martin A.B.; Alcon A.; Santos V.E. y Garcia-Ochoa F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy Fuels*. **18**, 851-857

Martinez, I, **2013**. Biodesulfuración de dibenzotofeno con *Pseudomonas putida* KTH2: una aproximación al cambio de escala del proceso. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

McCloskey, K.E., **2011**. Effects of shear stress on cells. *Comprehensive Biotechnol.* **1**, 615-623.

McFarland, B.L., **1999**. Biodesulfurization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 257-264.

Midler, M. y **Finn**, R. K., **1966**. A model system for evaluating shear in the design of stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **8**, 71-84.

Mehmood, N.; Olmos, E.; Marchal, P.; Goergen, J.L. y Delaunay, S. **2010**. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{La} . *Process. Biochem.* **45**, 1779-1786.

Mehmood, N.; Olmos, E.; Goergen, J.L.; Blanchard, F.; Ullisch, D, Klockner, W.; Buchs, J. y Delaunay, S., **2011**. Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 2151-2161.

Meijer, J.J.; Ten Hoopen, H.J.G.; Van Gameren, Y.M.; Luyben, K.Ch.A.M. y Libbenga, K.R., **1994**. Effects of hydrodynamic stress on the growth of plant cells in batch and continuous culture. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 467-477.

Merchuk, J.C., 1991. Shear effects on suspended Cells. *Advances Bio. Eng.* **44**, 65, 1-31.

Moes, J.; Griot, M.; Keller, J.; Heinzle, E.; Dunn, I. J. y Bourne, J. R., 1985. A microbial culture with oxygen sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 482-489.

Moo-Young, M. y Blanch, H.W., 1987. Transport phenomena and bioreactor design. *Basic Biotechnology*. Eds> J. Bu'lock y B. Kristiansen. Academic Press. Londres. **5**, 133-172.

Nekodzuka, S.; Toshlaki, N.; Nakallma-Kambe, T.; Nobura, N.; Lu, J. y Nakahara, Y., 1997. Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Mycobacterium* strain G3. *Biocatal. Biotransform.* **15**, 21-27.

Nishikawa, M.; Nakamura, M., Yagi, H. y Hashimoto, K., 1981. Gas absorption in aerated mixing vessels. *J. Chem. Eng. Jpn.* **14**, 219-226

Nienow, A.W., 2006. Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology.* **50**, 9-33.

Ohshiro, T.; Hine, Y. e Izumi, Y., 1994. Enzymatic desulfurization of DBT by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**, 341-344.

Ohshiro, T.; Hirata, T.; Hashimoto, I. e Izumi, Y., 1996. Characterization of DBT desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 610-612.

Ohshiro, T. e Izumi, Y., 1999. Review: Microbial desulfurization of organic compounds in petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1-9.

Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. y Kulpa, C., 1997. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology.* **143**, 2961-2973.

Oldshue, J.Y., 1983. Fluid Mixing Technology. McGraw-Hill Chemical Engineering Series. Minnesota. 574.

Olmo, C.H., 2004. Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., 2005a. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., 2005b. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **22**, 229-237.

Olmos, E.; Mehmood, N.; Haj Husein, L.; Goergen, J.; Fick, M. y Delaunay, S., 2013. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 259-272.

Palomares, L.A. y Ramirez O., 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology.* **22**, 225-237.

Palomares, L.A.; Lopez, S. y Ramirez O., 2004. Utilization of oxygen uptake rate to asses the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cells cultures. *Biochem. Eng. J.* **19**, 87-93.

Papoutsakis, E. T., 1991. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. *TIBTECH.* **9**, 427-437.

Pilz, R.D. y Hempel, D.C., 2005. Mechanical stress on suspended particles in two- and three-phase airlift loop reactors and bubble columns. *Chem. Eng. Sci.* **60**, 6004-6012.

Pohorecki, R.; Baldyga, J.; Ryszczyk, A. y Motyl, T., 2001. Erythrocyte destruction during turbulent mixing. *Biochem. Eng. J.* **9**, 147-154.

Puthli, M.S.; Rathod V.K. y Pandit A.B., 2005. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **23**, 2-30.

Raheb, J.; Hajipour, M.J. y Memari, B., 2010. Increasing of biodesulfurization activity of newly recombinant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 by cloning the flavin reductase gene. *International Biochem. Eng. J.* **6**, 219-229.

Rath, K.; Mishra, B. y Vuppu, S., **2012**. Bio degrading ability of organo-sulphur compound of a newly isolated microbe *Bacillus sp.* KS1 from the oil contaminated Soil. Arch. Appl. Sci. Res. **4**, 465-471.

Reichmuth, D.S.; Hittle, J.L.; Blanch, H.W. y Keasling, J., **2000**. Biodesulfurization of dibenzothiophene in *Escherichia coli* is enhanced by expression of a *Vibrio harveyi* oxidoreductase gene. Biotechnol. Bioeng. **67**, 72-79.

Rodriguez-Monroy, M. y Galindo, E., 1999. Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. Enzyme Microb. Technol. **24**, 687-693.

Rodriguez-Monroy, M. y Galindo, E., 2003. Las células vegetales. ¿Frágiles para crecer en biorreactores?. Biotecnología. **8**, 6-17.

Sahoo, S.; Verma, R.K.; Suresh, A.K.; Rao, K.K.; Bellare J. y Suraishkumar G.K., **2003**. Macro-Level and Genetic-Level Responses of *Bacillus subtilis* to Shear Stress. Biotechnol. Prog. **19**, 1689-1696.

Santos, V.E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F., **2006**. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. Biochem. Eng. J. **32**, 198-204

Sato, M.; Nagayama, K.; Kataoka, N.; Sasaki, M. y Hane, K., **2000**. Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. J. Biomech. **33**, 127-135.

Schäfer, S.; Schradser, J. y Sell, D., **2004**. Oxygen uptake rate measurements to monitor the activity of terpene transforming fungi. Process. Biochem. **39**, 2221-2228.

Shavandi, M.; Sadeghizadeh, M.; Zomorodipour, A. y Khaleh, K., **2009**. Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RPI90A. Bioresource Technol. **100**, 475-479.

Setti, L.; Lanzarini, G. y Pifferi, P.G., **1997**. Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. Fuel Process. Technol. **52**, 145-153.

Shiragami, N., **1997**. Effect of shear rate on hybridoma cell metabolism. *Bioprocess. Eng.* **16**, 345-347.

Singh, R. y **Ghosh**, S.K., **2004**. *Industrial biotechnology*. Global vision publishing house, Dehli. 360.

Sittig, W. y **Heine**, H., **1977**. Experiences with large-scale industrial bioreactors. *Chem. Eng. Technol.* **49**, 595-605.

Soleimani, M.; Bassi, A. y Margaritis, A., **2007**. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnol. Adv.* **25**, 570-596.

Soule, J.C.; Wilhelm, A.M.; Riba, J.P. y Ambid, C., **1987**. Bioréacteur à contraintes mécaniques contrôlés. Application à la culture in vitro de cellules végétales. *Entropie.* **23**, 24-31.

Srinivasaraghavan, K.; Sarma, P.M. y Lal, B., **2006**. Comparative analysis of phenotypic and genotypic characteristics of two desulfurizing bacterial strains, *Mycobacterium phlei* SM120-1 and *Mycobacterium phlei* GTIS10. *LAM.* **42**, 483-489.

Stanislaus, A.; Marafi, A. y Rana, M., **2010**. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal. Today.* **37**, 153-168.

Stolberg, S. y **McCloskey** K.E., **2009**. Can Shear Stress Direct Stem Cell Fate? *Biotechnol. Prog.* **25**, 10-19.

Sun, L.X.; Zhang X.; Tan, W.S. y ;Zhu, M.L., **2012**. Effect of agitation intensity on the biooxidation process of refractory gold ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* **127-128**, 99-103.

Tao, F.; Liu, Y.; Luo, Q.; Su, F.; Xu, Y.; Li, F.; Yu, B.; Ma, C. y Xu, P., **2011**. Novel organic solvent-responsive expressions vectors for biocatalysis: Application for development of an organic solvent tolerant strain. *Bioresource Technol.* **102**, 9380-9387.

Taguchi, H. y **Humphrey**, A., **1966**. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems, *J. Ferment. Technol.* **44**, 881-889.

Takeda, T.; Seki, M. y Furusaki, S., **1994**. Hydrodynamic damage of cultured cells of *Carthamus tinctorius* in a stirred tank reactor. J. Chem. Eng. Jpn. **27**, 466-471.

Takors, R., **2012**. Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions. J. Biotechnol. **160**, 3-9.

Tobajas, M.; Garcia-Calvo E.; Siegel MH. y Apitz S.E., **1999**. Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. Chem. Eng. Sci. **54**, 5347-54.

Tremier, A.; de Guardia, A.; Massiani, C.; Paul, E. y Martel, J.L., **2005**. A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. Bioresource Technol. **96**, 169-180.

Trujillo-Roldan, M.A. y **Valdez-Cruz**, N.A., **2006**. Hydrodynamic stress: death and cellular damage in agitated cultures. Rev. Latinoam. Microbiol. **48**, 269-280.

Van't Riet, K., **1979**. Review of measuring methods and nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. **18**, 357-364.

Van't Riet, K., **1983**. Mass transfer in fermentation. Trends. Biotech. **1**, 113-119.

Wang, M.D.; Li, W.; Shi, Y.; Wang, D.H. y Feng, H., **2006**. Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium sp.* ZD-1 in the presence of organic phase. J. Zhejiang Univ. Sci. A. **7**, 371-375.

Wang, Z.J.; Wang, H.Y.; Li, Y-L.; Chu, J. y Huang, M.Z., **2010**. Improved vitamin B12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process. Bioresource Technol. **101**, 2845-2852.

Wagner, F. y **Vogelmann**, H., **1977**. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. Plant tissue culture and its biotechnological application. Ed. Barz W, Reinhard E, Zenk MH. 245-255.

Whitman, W.G., **1923**. Preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. Chem. Met. Eng. **29**, 146-148.

Xi, L.; Squires, C.H.; Monticello, D.J. y Childs, J.D., **1997**. A flavin reductase stimulates DszA and DszC proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 73-75.

Yagi, H. y Yoshida, F., 1975. Gas absorption by Newtonian and non-Newtonian fluids in sparged agitated vessels. *Ind. Eng. Chem. Process. Des Dev.* **14**, 488-93.

Yang, J.D. y Wang N.S., 1992. Oxygen mass transfer enhancement via fermentor headspace pressurization. *Biotechnol. Prog.* **8**, 244-251.

Yang, J.Z.; Hu, Y.; Zhao, D.; Wang, S.; Lau, P.C. y Marison, I.W., **2007**. Two layer continuous-process design for the biodesulfurization of 2 diesel oils under bacterial growth conditions. *Biochem. Eng. J.* **37**, 212-218.

Yepez, B.O. y Maugeri, F., 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 717-724.

Zhang, Z.; Ferenczi, M.A.; Lush, A.C. y Thomas, C.R., **1991**. A novel micromanipulation technique for measuring the bursting strength of single mammalian cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 208-210.

Zhou, W. K.; Holzhamer-Rieger; Dors, M. y Schugerl, K., **1992**. Influence of dissolved oxygen concentration on the biosíntesis of cephalosporine *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 848-854.

ZoBell, C.E., 1953. Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus. US Patent. **2**, 641.564.

Zou, X.; Hang, H. ; Chu, J. ; Zhuang, Y. y Zhang, S., **2009**. Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372m³ scale. *Bioresource Technol.* **100**, 1406-1412.

CAPÍTULO 2.
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo descrito en esta Memoria ha precisado del uso de distintos materiales, la utilización de diferentes equipos y la puesta a punto de diversas técnicas, tanto de experimentación como de análisis. En esta sección, se describen las características más importantes de los materiales, los equipos y las técnicas que se han empleado.

2.1. MATERIALES EMPLEADOS

A continuación, se detallan los aspectos relacionados con los microorganismos empleados, los reactivos, equipos y medios de crecimiento utilizados durante la fase experimental para su cultivo y manipulación, así como para la evaluación de su actividad desulfurante.

2.1.1. Microorganismos

Para la realización de este estudio se emplearon tres microorganismos con características y capacidades metabólicas distintas, suministrados por el Dr. José Luis García López, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid): *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural.

- ***Rhodococcus erythropolis* IGTS8**

Se trata de una bacteria gram-positiva, aerobia y perteneciente al género de los actinomicetos norcadioformes. Su forma característica es bacilar (Figura 2.1), crece agrupada en colonias anaranjadas, pudiendo llegar a formar estructuras filamentosas ramificadas. Su intervalo de temperatura de crecimiento se encuentra entre 30 y 37 °C, poseyendo una elevada capacidad de adaptación a diferentes ambientes.

En general, estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, de manera particular en suelos y ambientes acuáticos, y no poseen cualidades patógenas (Sánchez y col., 2004). Esta bacteria resulta de interés para la industria biotecnológica por tener la capacidad de poder transformar el dibenzotiofeno (DBT), molécula modelo que representa un grupo de moléculas aromáticas azufradas presentes en los hidrocarburos, en 2-hidroxibifenilo (HBP), molécula libre de azufre, mediante la ruta de desulfuración conocida como 4S (Oldfield y col., 1997).

Los genes implicados en la desulfuración del DBT constituyen el sistema *dsz* y fueron identificados y clonados para *R. erythropolis* IGTS8 en 1993 (Denome y col., 1993). Después, dos grupos de investigación (Denome y col., 1994; Piddington y col., 1995) analizaron la secuencia de DNA simultáneamente. Ésta incluye cuatro genes, *dszA*, *dszB*, *dszC* y *dszD*, también conocidos como *soxA*, *soxB*, *soxC* y *soxD* (Denis-Larose y col., 1997), que codifican para las enzimas DszA, DszB, DszC y DszD, respectivamente. Los tres primeros genes (*dszA*, *dszB* y *dszC*) están bajo el control de un promotor sencillo (Oldfield y col., 1997). Li y col. (1996) identificaron la región promotor y el lugar de comienzo de la transcripción. El cuarto gen *dszD*, que se encuentra en el cromosoma de la célula, a diferencia de los otros tres que se encuentran en un plásmido, fue clonado y secuenciado en *R. erythropolis* IGTS8 (Matsubara y col., 2001) y codifica para la enzima DszD.

En 1995, se descubrió la necesidad de un aporte de poder reductor en forma de NADH, FMN o FAD para que la ruta 4S pudiese llevarse a cabo eficientemente. La actividad de las enzimas DszA y DszC dependen de la oxidación de NADH y de la oxidación de FMN, lo que hizo pensar que debía existir una NADH:FMN oxidorreductasa, DszD, que regenerase el poder reductor para estas dos enzimas (Ohshiro y col., 1994 y 1995). En *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se ha denominado a esta enzima NADH:FMN oxidorreductasa como “DszD”, que es una proteína de 20

kDa, que proporciona FMNH₂ a las enzimas DszA y DszC (Xi y col., 1997; Gray y col., 1996).

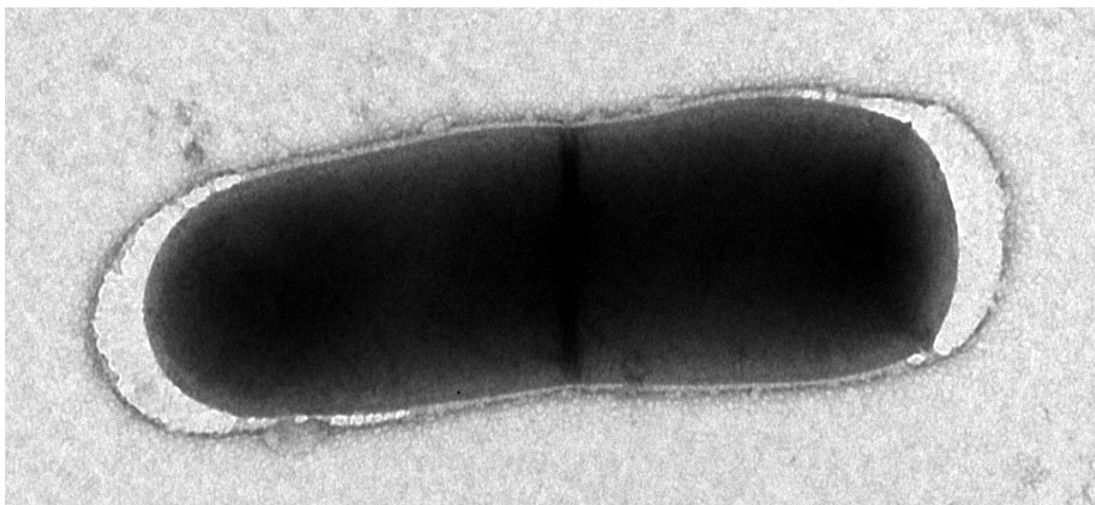


Figura 2.1 - Micrografía electrónica de transmisión de *R. erythropolis* IGTS8.

- ***Pseudomonas putida***

Se trata de un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvado, dotado de uno o varios flagelos polares (Figura 2.2). Es una bacteria quimioheterótrofa, aerobia estricta y catalasa positiva. No forma esporas ni fermenta azúcares (Palleroni y Doudoroff, 1972; Brenner y col., 2005). La forma natural de *Pseudomonas putida* es muy abundante en la naturaleza. Tiene gran importancia en la degradación aerobia de compuestos orgánicos aromáticos y es capaz de habitar zonas afectadas por vertidos, así como degradar compuestos antropogénicos y recalcitrantes. Las subespecies de *Pseudomonas putida* son muy empleadas en la industria biotecnológica debido a su abundancia en la naturaleza, su relativamente alta tolerancia a disolventes orgánicos y su facilidad de manipulación genética (Poblete-Castro y col., 2012).

Pseudomonas putida KTH2 es un organismo modificado genéticamente capaz de expresar los genes de la ruta 4S para desulfurar el DBT. Este microorganismo porta el operón *dszABC* procedente de *R. erythropolis* IGTS8 en un plásmido (Gallardo y col., 1997), y el gen *hpaC* de *Escherichia coli* W integrado en el cromosoma (Galan y col., 2000).

Los genes *dszABC* de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se introdujeron en *Escherichia coli* para construir un *cassete* recombinante cuya expresión se controla por medio de un promotor heterólogo con el que se logró eliminar la represión de la ruta por presencia de compuestos azufrados. El resultado es el plásmido pESOX1, que aporta la capacidad de desulfurar DBT en células de *Escherichia coli* JM109 (Gallardo y col., 1997). El plásmido pESOX1 se clonó en el plásmido PVL31 bajo el control del promotor *Ptac*. El resultado es el plásmido pESOX3, inducible por isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG) y con un gen de resistencia a tetraciclina. Este plásmido contiene un fragmento denominado DNARP4, que permite su movilización y transferencia a otras cepas receptoras (Gallardo y col., 1997). El plásmido pESOX3 que contiene los genes *dszABC* se introdujo en *Pseudomonas putida* KT2442 demostrándose su capacidad desulfurante (Gallardo y col., 1997).

La enzima DszD de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 es una FMN:NADH reductasa que aporta el FMNH₂ necesario para el funcionamiento de las monooxigenasas DszA y DszC (Gray y col., 1996). También es posible utilizar para este propósito flavin reductasas heterólogas (Xi y col., 1997; 1996; Galan y col., 2000). Para el diseño de *Pseudomonas putida* KTH2 se ha utilizado la reductasa HpaC de *Escherichia coli* W, insertando el gen *hpaC* en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2442, bacteria que lleva el plásmido pESOX3. De esta manera se consiguió un biocatalizador con más actividad que *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Gallardo y col., 1997; Galan y col., 2000).

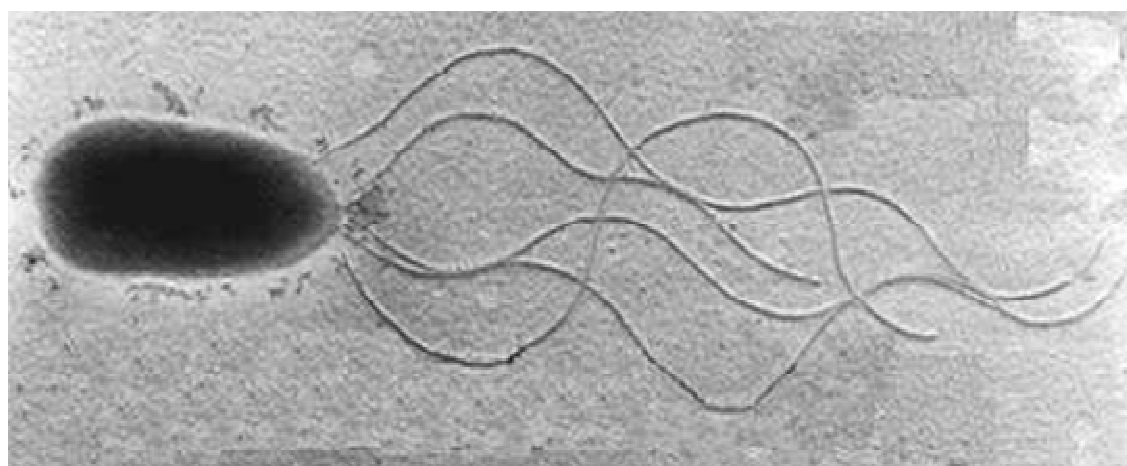


Figura 2.2 - Micrografía electrónica de transmisión de *Pseudomonas putida*.

2.1.2. Reactivos

El cultivo de las bacterias ha requerido la utilización de distintos medios que proporcionan los requisitos nutricionales a los microorganismos para la obtención de un adecuado crecimiento y un elevado rendimiento, en este caso, en la capacidad desulfurante. En la Tabla 2.1 se muestran las sustancias químicas que han sido empleadas para la formulación de los medios de cultivo necesarios para la conservación, el mantenimiento y el crecimiento de los microorganismos.

Asimismo, en la Tabla 2.2 quedan reflejados los reactivos empleados para medir el poder desulfurante en los ensayos de *resting cells* y su análisis mediante HPLC. Estos procedimientos experimentales serán descritos más adelante.

Tabla 2.1 - *Reactivos empleados en la formulación de los medios de cultivo.*

Compuesto	Marca	Pureza (%)	Código
Agar-agar	Panreac	-	141792
Triptona	Fluka	-	70194
Extracto de levadura	Fluka	-	70171
NaCl	Panreac	99,5	121659
Tetraciclina	Fluka	95	T- 3258
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Calbiochem	98,8	567549
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	Panreac	99	121512
NH ₄ Cl	Panreac	>99,5	141121
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Probus	95	120410
CaCl ₂ ·H ₂ O	Riedel de Haen	95	12018
FeCl ₂ ·6H ₂ O	Riedel de Haen	99	31232
Glicerol	Panreac	Puro	211339
2-propanol	Panreac	99,8	131090
Acido L-glutámico	Panreac	98,5	142042
Isopropil-β- D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma	Puro	1- 6758
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Probus	Puro	121310
NaOH	Riedel de Haen	99	30620
HCl	Panreac	37	131013
Silicona líquida antiespumante	Panreac	-	211628
Glucosa	Panreac	Puro	141341
Dymethyl sulfoxido (DMSO)	Sigma	99,5	D-5879
Tris	Panreac	Puro	131940

Tabla 2.2 - Reactivos para la medida del poder desulfurante en resting cells.

Compuesto	Marca	Pureza (%)	Código
HEPES (N-2-Hidroxiethyl)-piperazine-N'-(2-acido etanosulfónico)	Panreac	99	375229
Dibenzotiofeno (DBT)	Aldrich	99	34,783-3
Dibenzotiofeno sulfoxido (DBTO)	Sintetizado por el Grupo de Investigación		
Dibenzotiofeno-5,5-dioxido (DBTO ₂)	Aldrich	97	D3,240-7
2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato (HBPS)	Sintetizado por el Grupo de Investigación		
2-Hidroxibifenilo (HBP)	Aldrich	99	P2, 826-3
Acetonitrilo	SDS	> 99,9 %	0063721

- **Síntesis de reactivos no comerciales**

Entre los compuestos que forman parte de la ruta 4S se encuentran DBTO y HBPS, ninguno de los cuales se comercializaba al iniciarse este trabajo, por lo que ha sido necesaria su síntesis en el laboratorio. El Dr. Pedro Yustos Cuesta, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid, realizó la síntesis de ambos compuestos siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

- *Dibenzotiofeno sulfóxido: DBTO*

Se disuelven 5 g de DBT (27,17 mmol) en 60 mL de metanol. Esta disolución se introduce en un matraz de tres bocas equipado con un condensador de flujo, un embudo de goteo y tubos de entrada y salida de nitrógeno. Este matraz se mantiene a 64 °C en un baño de cloroformo/nitrógeno líquido. Se adicionan 3 g de hipoclorito de t-butilo (27,65 mmol). El hipoclorito de t-butilo se prepara por reacción del alcohol t-butílico a 0 °C con 1 equivalente de una disolución comercial de hipoclorito de sodio y 1 equivalente de ácido acético. Entonces se separa y se seca sobre sulfato de sodio, obteniendo un aceite amarillo, con Bp = 77-78° / 760 mmHg); esta mezcla se agita durante 30 minutos. Después, se añade carbonato de sodio anhidro (3 g, preparado por secado a 210 °C durante 12 horas) y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente, con agitación. La disolución se filtra y se elimina el metanol en un rotavapor. El sólido blanco obtenido (5,16 g, con un rendimiento del 95 %) se recristaliza con metanol. Este producto se

analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, detector MSD 5973), para lo cual se utiliza una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 μ m de diámetro, en las siguientes condiciones: gas portador Helio 1,8 mL/min, TI=250 °C, Td=230 °C, Horno (T0=200 °C, 1 minuto, velocidad=25 °C/min, T1=220 °C, 3 min, velocidad=3 °C/min, T2=250 °C, 20 min, tiempo total=34,8 min), relación de split=40:1. El análisis por GC-MS del producto indicó DBT-sulfóxido con una pureza mayor del 90 %.

○ 2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfinato: HBPS

Se prepara una disolución de 10 g de o-hidroxibifenil (59 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno, que se añade a una segunda disolución de 4,7 mL de cloruro de tionilo (64 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno, a 0 °C en helio seco. Después se adicionan 82 mL de trietilamina (58 mmol) por goteo durante 5 minutos. La mezcla se agita a 0 °C durante 25 minutos y a 25 °C durante 15 minutos más. Se añaden, con agitación vigorosa, una suspensión de 16 g de cloruro de aluminio (120 mmol) en 250 mL de cloruro de metileno, a 0 °C en helio seco. Se obtiene una disolución de color verde oscuro que se mantiene en agitación durante una hora a 0 °C, y después a 25 °C durante 12 horas. Se añaden 250 mL de agua, se filtra, se lava con 300 mL de ácido 3N, se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente. Así se obtiene un aceite rojo anaranjado (9,02 g y rendimiento del 71 %) que cristaliza rápidamente: Mp 94-97 °C. Este producto se analiza por GC/MS (HP6890 GC-MS, con detector MSD 5973), empleando una columna HP-INNOWAX (Crosslinked PEG) 30 m x 0,25 mm con partículas de 0,25 μ m de diámetro, en las siguientes condiciones: gas portador Helio 1,8 mL/min, T=250 °C, TD=230 °C, T0=250 °C, tiempo total 30 minutos, relación de split=40:1. El análisis por GC-MS del producto mostró la obtención de HBPS con una pureza mayor del 95 %.

2.1.3. Composición de los medios empleados

En este apartado se describe la composición de los medios empleados en la obtención, el mantenimiento y la conservación de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (Olmo y col., 2005), de *Pseudomonas putida* KTH2 (Martin y col., 2004) y de *Pseudomonas putida* natural, así como la composición de la disolución tampón empleada en los ensayos de desulfuración.

- **Medio LB (Luria-Bertani)**

Es un medio complejo que se emplea para el crecimiento rápido de los microorganismos. En este trabajo se ha utilizado para la preparación del inóculo y a fin de obtener los *stocks* para su conservación. En la Tabla 2.3 se muestran los compuestos que forman parte del medio LB así como su concentración en el mismo.

En el caso de *Pseudomonas putida* KTH2, para la formulación del medio LB es necesario, además, añadir una disolución de tetraciclina en su composición. De esta disolución, se tomó el volumen necesario para alcanzar una concentración final de $25 \cdot 10^{-3}$ g/L de tetraciclina en un volumen de 50 mL (incluyendo el volumen del inóculo). La disolución de tetraciclina se purifica por filtración en la cámara de flujo, haciendo uso de un filtro estéril con un tamaño de poro de 0,2 μ m. Se debe diluir en una disolución de agua y 2-propanol, en una proporción de 50:50, y guardar en un tubo de ensayo y protegido contra la luz a -18 °C.

Tabla 2.3 - Composición del medio LB (Luria-Bertani).

Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
NaCl	10
Triptona	5

- **Medio BSM (Basal Salt Medium)**

Es un medio sintético, de composición definida, empleado para el cultivo de microorganismos en condiciones controladas. Contiene la fuente de carbono, de nitrógeno y de azufre en formas asimilables por los microorganismos, junto con determinados oligoelementos necesarios para su crecimiento.

En la Tabla 2.4 se muestra los compuestos que forman parte del medio BSM común a todos los microorganismos y su concentración final en el mismo. Para la formulación de este medio se emplearon cuatro disoluciones madre, denominadas en este trabajo disoluciones A, B, C y D, de las que se tomaron los volúmenes necesarios para alcanzar la concentración final deseada en el volumen final de medio (incluyendo el volumen del inóculo). La composición de las cuatro disoluciones se muestra en la Tabla 2.5.

En el caso de cultivos de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, además de los compuestos mencionados en la Tabla 2.4 del medio BSM, se añadió como fuente de azufre DMSO en una concentración de 1,3 mM; como fuente de carbono, glucosa en una concentración de 20 g/L y una disolución tampón TRIS. La disolución de DMSO se esteriliza por filtración en la cámara de flujo. La composición del tampón TRIS es 12,1 g/L de TRIS y 5,8 g/L de NaCl. El pH debe ajustarse a un valor de 7,3 con HCl.

En los cultivos de la cepa *Pseudomonas putida* KTH2, además de los compuestos mencionados en la Tabla 2.4 del medio BSM, se añadió como fuente de azufre $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, en una concentración de 0,44 g/L; como fuente de carbono, ácido glutámico, en una concentración de 20 g/L y, además, silicona líquida antiespumante, en una concentración de 0,5 mL/L. A su vez, debe adicionarse una disolución de tetraciclina e IPTG en su composición. De estas disoluciones se tomó el volumen necesario para alcanzar una concentración final de $25 \cdot 10^{-3}$ g/L y $2 \cdot 10^{-6}$ g/L, respectivamente. La disolución de tetraciclina se prepara de una manera similar al caso en que se utiliza en la formulación del medio LB. La disolución de IPTG se esteriliza por filtración en la cámara de flujo.

Finalmente, en los cultivos de *Pseudomonas putida* natural, además de los compuestos mencionados en la Tabla 2.4 del medio BSM, se añadió como fuente de azufre $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, en una concentración de 0,44 g/L; como fuente de carbono, ácido glutámico, en una concentración de 20 g/L y, además, silicona líquida antiespumante, en una concentración de 0,5 mL/L.

Tabla 2.4 - Composición del medio BSM (Basal Salt Medium) común a todos los microorganismos.

Compuesto	Concentración (g/L)
$NaHPO_4 \cdot H_2O$	4
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	4
NH_4Cl	2
$Ca Cl_2 \cdot 2 H_2O$	$1 \cdot 10^{-3}$
$Fe Cl_3 \cdot 6 H_2O$	$1 \cdot 10^{-3}$
Glicerol	$24,5 \cdot 10^{-3}$
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	$24,5 \cdot 10^{-3}$

Tabla 2.5 - Composición de la disolución A, B, C y D para formular el medio BSM.

	Compuesto	Concentración (g/L)
	NaHPO ₄ · H ₂ O	40
Disolución A:	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	40
	NH ₄ Cl	20
Disolución B:	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	50
Disolución C:	Ca Cl ₂ · 2 H ₂ O	5·10 ⁻⁴
Disolución D:	Fe Cl ₃ · 6 H ₂ O	5·10 ⁻⁴

- **Medio HEPES**

El medio en que se realizaron los experimentos para evaluar la capacidad desulfurante del biocatalizador fue un tampón HEPES, ácido (N-2-hidroxietil)-piperazine-N²-(2-ácido etanosulfónico), con una concentración de 12 g/L. El medio tampón HEPES ha sido formulado para conseguir un pH de 7,3 en disoluciones acuosas, sin que pueda ser utilizado como nutriente por el microorganismo.

2.2. EQUIPOS

En este apartado se describen los equipos e instalaciones necesarios para llevar a cabo la experimentación realizada en este trabajo.

Para obtener datos experimentales se han realizado experimentos en fermentadores comerciales, empleando incubadoras orbitales para la preparación de inóculos y para la realización de ensayos de biodesulfuración (biodesulfuración en *resting cells*). Además, ha sido necesaria la utilización de otros equipos y se ha dispuesto de diferentes técnicas de medida para analizar la evolución de los diferentes componentes del sistema objeto de estudio.

2.2.1. Equipos para el cultivo de células

- **Matraces agitados**

En el desarrollo y optimización de bioprocesos, los matraces *Erlenmeyer* agitados son los biorreactores mas ampliamente utilizados por su bajo coste y fácil manejo. En este trabajo se ha utilizado en las primeras etapas de desarrollo del proceso, donde tener condiciones experimentales controladas y reproducibles son esenciales.

El crecimiento del microorganismo se llevó a cabo en *Erlenmeyers* tronco-cónicos de borosilicato, de 250 mL de capacidad y con 50 mL de medio de cultivo. Para su agitación se utilizó una incubadora de la casa GALLENKAMP, modelo INR-200 (Figura 2.3), con las siguientes características: intervalo de temperatura entre 5 a 70 °C, fluctuación de temperatura en su interior de $\pm 0,1$ °C, intervalo de velocidad de agitación entre 0-400 rpm, radio orbital de 32 mm y capacidad para 30 *Erlenmeyers* de 250 mL.



Figura 2.3 - Fotografía de la incubadora orbital GALLENKAMP, modelo INR-200.

- **Biorreactor**

Los experimentos para el cultivo controlado de células de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural, se llevaron a cabo en biorreactores comercializados por Sartorius BBI Systems. Se empleó el modelo BIOSTAT® B plus que se muestra en la Figura 2.4. Este modelo corresponde a un biorreactor de tipo tanque agitado, constituido por una cuba de cultivo y una unidad con sistema de medida, de control y de regulación de pH, de temperatura, de velocidad de agitación y de concentración de oxígeno disuelto.

El biorreactor cuenta con un software, MFCS/WIN 3.0, controlado por ordenador, que registra en línea y controla todas las variables y condiciones de funcionamiento del sistema.



Figura 2.4 - Fotografía del biorreactor modelo BIOSTAT B plus.

○ Cuba de cultivo

Está construida en vidrio de borosilicato, con un volumen total de 3 L y un volumen de trabajo de 2 L. Está formada por una doble pared de vidrio y una tapa de acero inoxidable, provista de orificios de diferentes diámetros para la conexión de sondas que permitan el control de variables, del condensador, la membrana de inoculación y las conexiones con otros recipientes.

En la Figura 2.5 se muestra el esquema del tanque de cultivo y en la Figura 2.6 se puede apreciar la vista superior de la tapa del biorreactor.

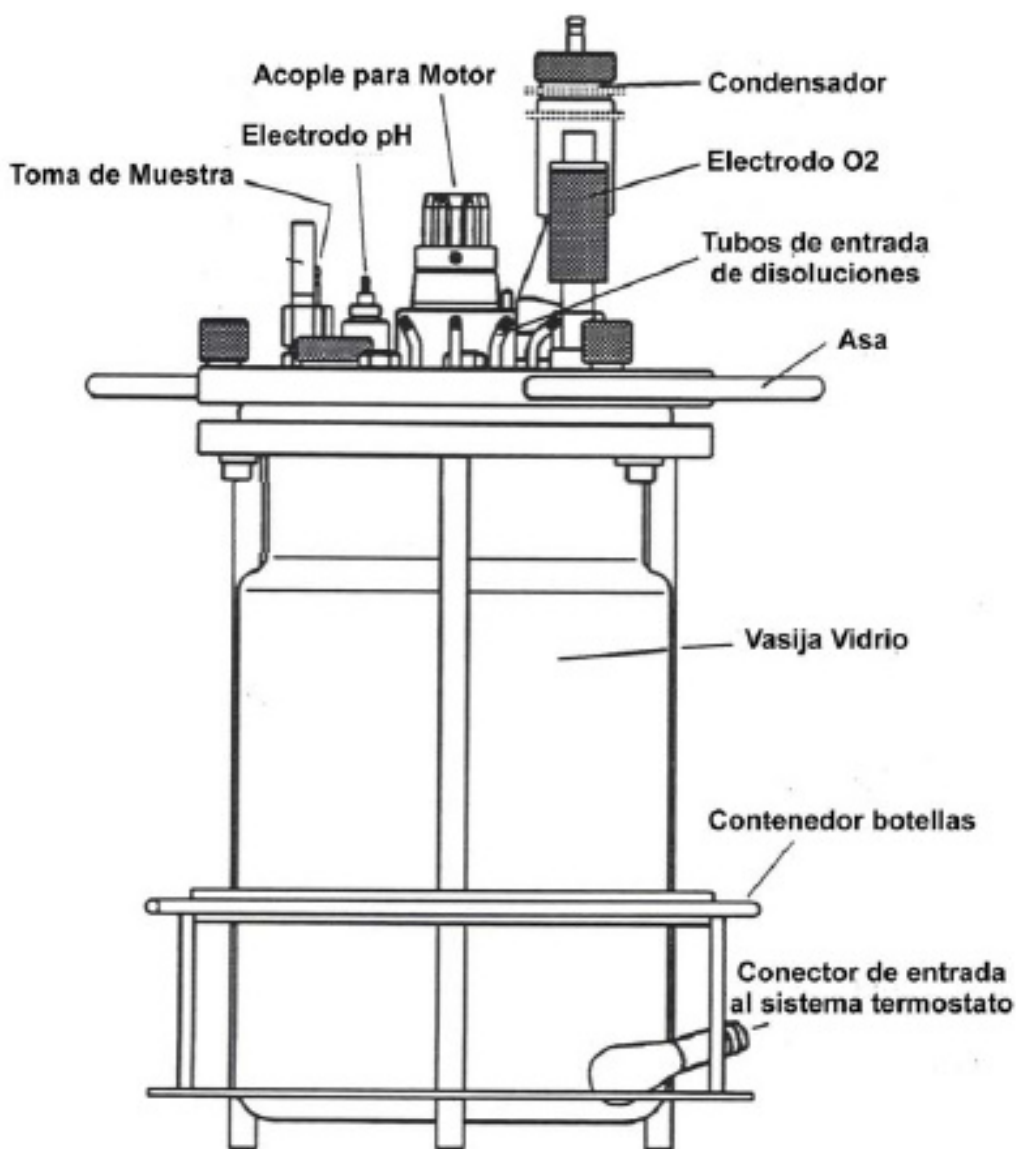
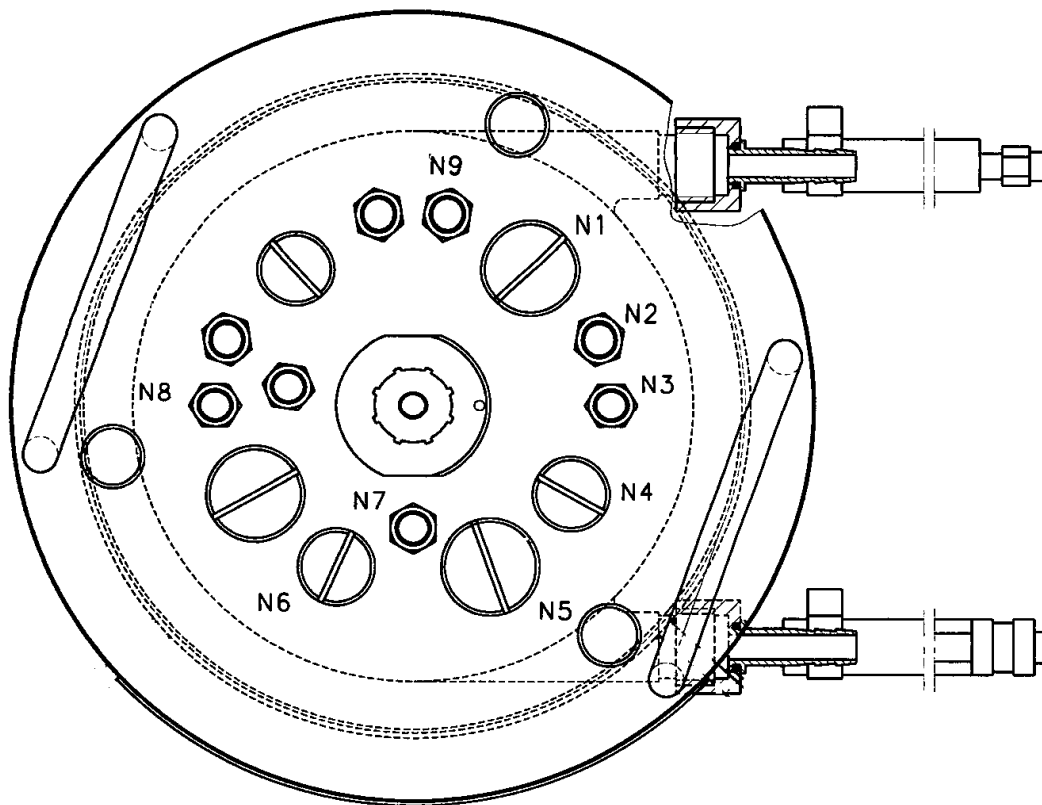


Figura 2.5 - *BIOSTAT B plus*: esquema del tanque de cultivo del Biorreactor.



N1	Condensador
N2	Membrana de inoculación
N3	Difusor de aire
N4	Sonda de Ph
N5	Tubos entrada de disoluciones
N6	Sonda de Oxígeno
N7	Estructura de tabiques deflectores
N8	Tubo toma de muestras
N9	Sonda de temperatura

Figura 2.6 - *BIOSTAT B plus*: vista superior de la tapa del biorreactor.

○ *Sistema de medida y control de la temperatura*

El biorreactor está equipado con un controlador digital PID. La temperatura del medio de cultivo es medida con un sensor Pt-100. Una vez el medio de cultivo alcanza la temperatura asignada, ésta se fija como consigna para que el sistema regule y controle el valor de temperatura asignada, actuando sobre la válvula de refrigeración y la resistencia eléctrica de 600 W. La temperatura de operación es seleccionada y ajustada mediante un indicador digital, con una sensibilidad de 0,1 °C. El intervalo de medida se encuentra entre 0 y 100 °C.

○ *Sistema de medida y control de la agitación*

La velocidad de agitación en el biorreactor se regula mediante un controlador digital PID ajustando la velocidad a través de un motor de 180 W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable, sobre la que se encuentran dos agitadores de turbina de seis palas planas. La velocidad de agitación se mide con un tacómetro ajustable entre 0 y 2000 rpm, con una resolución de ± 10 rpm.

○ *Sistema de control del caudal de aire*

La aireación de la cuba se consigue suministrando aire, por burbujeo, mediante un compresor, filtrándose a través de un filtro que posee una membrana de 0,2 μm , con el fin de conseguir la esterilización del aire introducido en el reactor. El aire se distribuye en el interior mediante un difusor toroidal. Su caudal es controlado mediante un sistema micro-DCU. Para el control de la velocidad del caudal de aire se utiliza un controlador de caudal másico. El controlador de caudal permite también la mezcla de dos gases (usualmente aire y oxígeno), de forma que se puede regular automáticamente la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido.

○ *Sistema de medida y control del pH*

Se realiza también con un controlador digital PID que actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal de medida, previamente amplificada. Se utiliza un electrodo Hamilton, cuyo intervalo de medida varía entre 2 y 12 unidades de pH. La calibración se realiza con un sensor digital.

○ *Sistema de medida y control del oxígeno disuelto*

La medida del oxígeno disuelto se realiza empleando un electrodo esterilizable, fabricado por Hamilton. Este electrodo funciona mediante el principio de polarización y consta de un ánodo de plata y un cátodo de platino (en una solución de cloruro de potasio) separados del medio de cultivo por una membrana de teflón permeable al oxígeno. Opera en un intervalo de medida de entre 0 y 500 % de saturación, disponiendo de una compensación de temperatura automática. La señal de medida es amplificada y convertida en una señal digital. La concentración de oxígeno disuelto, por su parte, puede ser controlada mediante la acción sobre el caudal de aire y/o bien mediante la velocidad de agitación, con un controlador PID en cascada.

○ *Parámetros del diseño mecánico*

Como se ha señalado anteriormente, el coeficiente de transferencia de oxígeno en biorreactores agitados y aireados es afectado por las condiciones de operación, las propiedades del medio y la geometría de la cuba, principalmente el agitador y el difusor de aire. En este apartado se describen y detallan los parámetros mecánicos de interés fluidodinámico.

En la Figura 2.7 se muestra una sección del tanque de cultivo, en la que se puede apreciar la situación de la turbina de agitación, el difusor de oxígeno y la estructura de los tabiques deflectores. También se distingue la doble pared de la cuba de fermentación, que constituye la camisa necesaria para termostatar el sistema.

En la Figura 2.8 se muestra un esquema del tanque y las dimensiones características del diseño, en el que también se puede apreciar las dimensiones y el posicionamiento de los agitadores tipo turbina.

En los experimentos llevados a cabo con *Pseudomonas putida*, fue necesario el uso de un disco rompe-espuma (Figura 2.9). El disco rompe-espuma es de material poliéter éter cetona (PEK), autoclavable. Se instala en el eje del agitador, próximo a la superficie del líquido. Se trata de un disco (de 8,4 x 3,3 cm) de dos capas con cuatro secciones. Su capa inferior tiene ranuras colocadas hacia abajo y paletas para barrer la espuma (de 2,5 x 1 cm). La espuma que se va formando entra en el disco por la parte inferior a través de las cuatro secciones de autocebado. Con la rotación del disco, la espuma se hace girar contra la pared del reactor haciendo que las fases gas-líquido se

separen. Mientras que la fase gas, más ligera, sale del reactor a través del condensador, la fase líquida cae de nuevo en el medio.

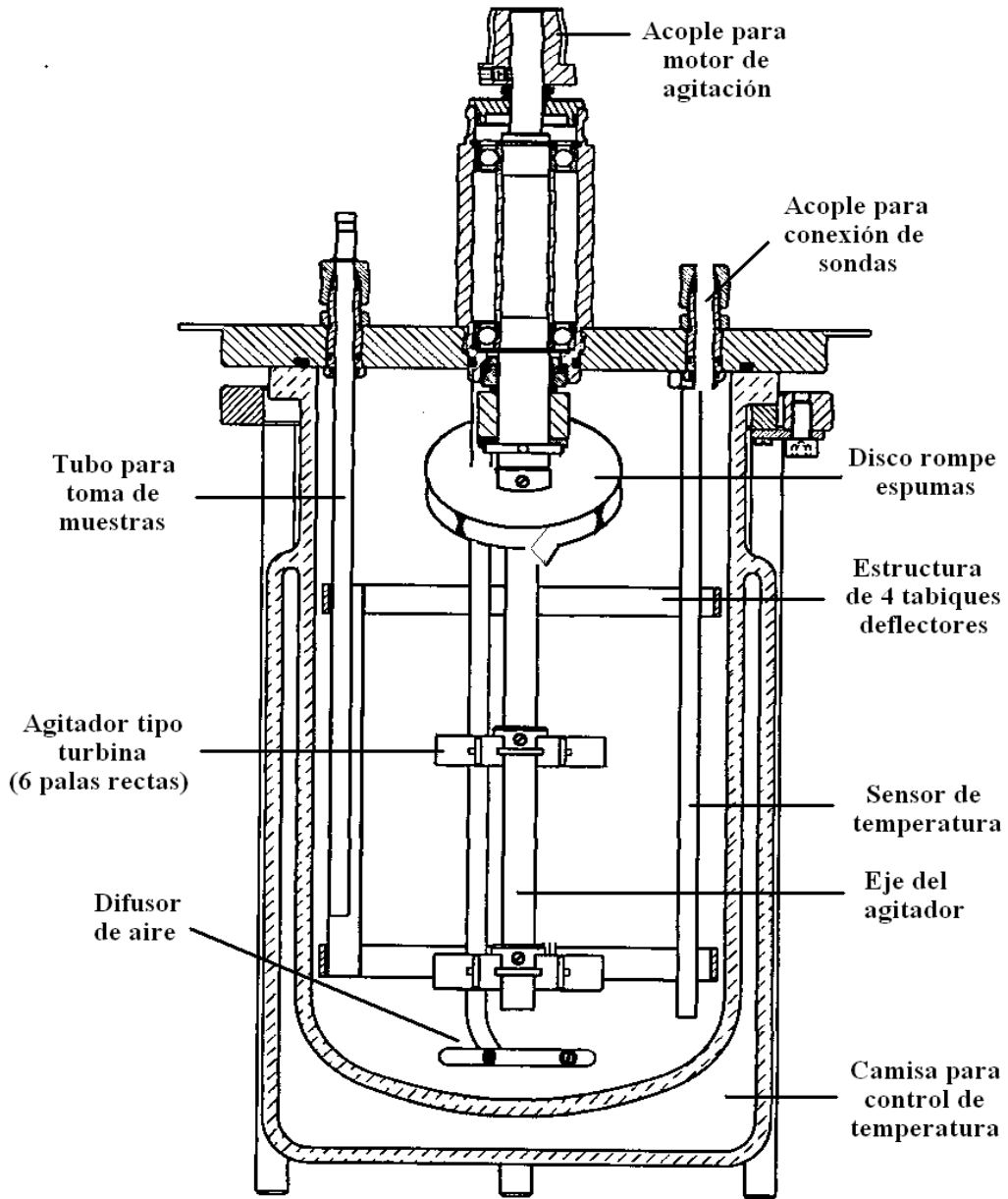


Figura 2.7 - Sección de la cuba de fermentación del biorreactor.

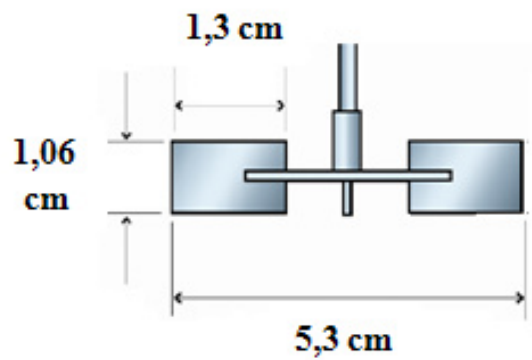
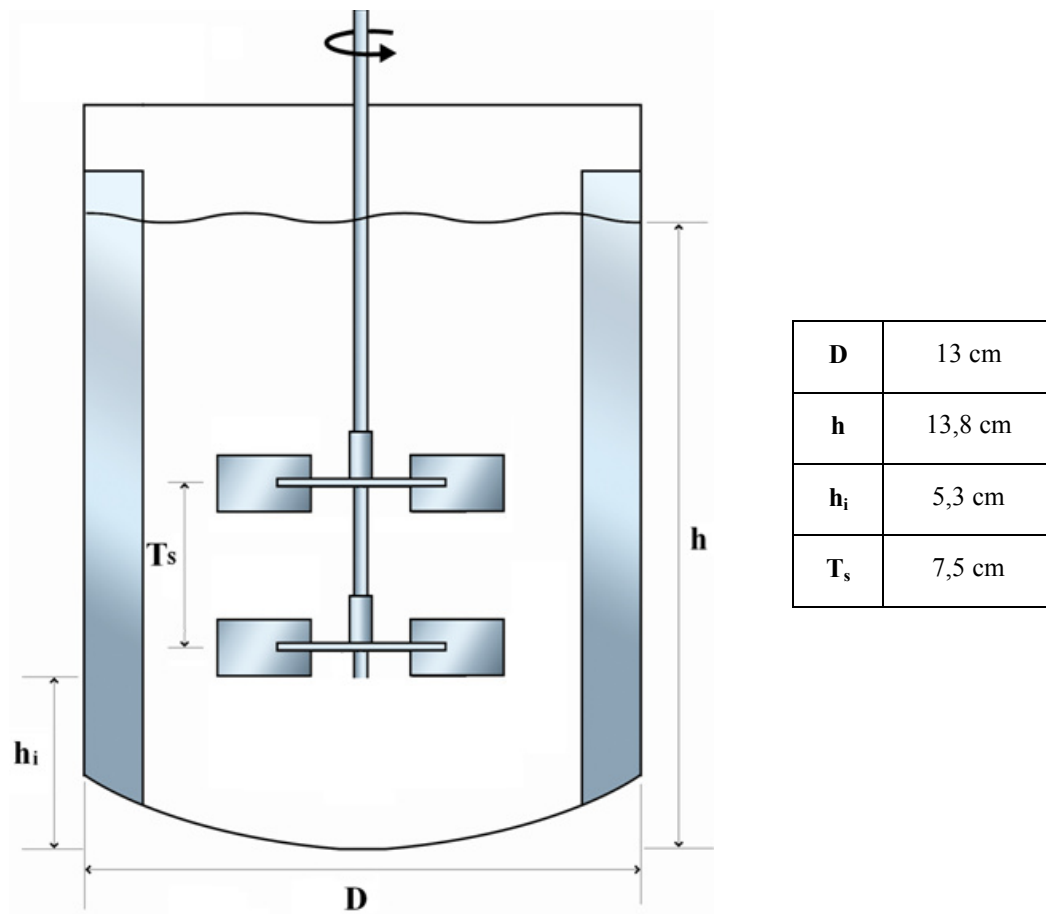


Figura 2.8 - Diseño del biorreactor con dos agitadores tipo turbina y 4 tabiques deflectores igualmente espaciados.



Figura 2.9 - Disco rompe-espuma.

2.2.2. Equipos de medida y análisis

- **Electrodo de pH**

Se ha utilizado un pH-metro de la casa CRISON, modelo BASIC 20, con electrodo de cuerpo de cristal y de aplicación general, con intervalo de medida de 2,00 a 16,00 unidades de pH. Su error de medida es de $\pm 0,02$ unidades de pH y la reproducibilidad de $\pm 0,01$ unidades de pH.

- **Balanza de precisión**

Para la medida de las masas de los diferentes compuestos empleados se ha utilizado una balanza digital marca SARTORIUS, modelo Handy. Esta balanza permite obtener pesadas del orden de miligramos con una precisión de $\pm 0,1$ mg.

- **Espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible**

La medida de absorbancia de las muestras se realiza en un espectrofotómetro UV/VIS de la firma SHIMADZU, modelo UV 1603. Las características técnicas que reúne son las descritas a continuación:

- Intervalo de medida de la longitud de onda: 190-1100 nm.
- Anchura de banda espectral: 2 nm.
- Lámpara de Deuterio (lámpara D2): la fuente de la luz está en el intervalo del ultravioleta.
- Lámpara Halógena de Tungsteno (lámpara WI): la fuente de luz está en el intervalo del visible y el infrarrojo próximo.

- **Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)**

El cromatógrafo empleado es de la marca Agilent Series 1100 con detector UV que incorpora un diodo de array. En la Figura 2.10 se muestra una imagen de este equipo, que consta de varios módulos:

- Detector UV-diodo de array: consta de una lámpara de deuterio cuya radiación se hace pasar a través de la muestra. La radiación emergente de la célula de caudal se dispersa por una red de difracción halográfica en radiaciones monocromáticas que se focalizan sobre un conjunto de fotodiodos. Permite obtener el espectro de absorción de la muestra en función de la longitud de onda y del tiempo en todo el intervalo UV-Vis.
- Detector de índice de refracción: consiste en un refractómetro diferencial que mide la desviación de un rayo de luz debida a la diferencia del índice de refracción entre los líquidos de las celdas de muestra y de referencia de una única celda de caudal. El haz de luz de la lámpara atraviesa la celda de caudal, que está dividida diagonalmente en las celdas de muestra y de referencia. En la parte posterior de la celda de caudal, un espejo refleja la luz, que atraviesa de nuevo la celda y dirige el haz a través de un cristal hasta el receptor de luz. El fotorreceptor de luz tiene dos diodos, cada uno de los cuales produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que recibe.
- Compartimento de columna: se trata de un compartimento termostatzado en el que se conecta la columna a través de la cual fluye la muestra mezclada con el eluyente.
- Desgasificador: elimina las posibles burbujas de gas presentes en los canales de eluyentes.
- Bomba cuaternaria: proporciona el caudal programado de eluyente. Permite generar gradientes de composición y caudal. Dispone de una válvula de purga para cebar la cabeza de la bomba.
- Sistema de inyección automático: consta de una bandeja portaviales, un brazo automático que toma el vial en el orden programado y una zona de inyección en

la que la jeringa extrae una cantidad de muestra y la introduce en una válvula de seis vías donde se mezcla con el eluyente.

El equipo de HPLC está controlado por un ordenador mediante el software Agilent ChemStation® de Agilent Technologies. Este software está organizado en diferentes ventanas y vistas que permiten:

- Controlar el método y condiciones de inyección análisis de las muestras, así como la adquisición y almacenamiento de datos.
- Analizar los datos obtenidos mediante sistemas de integración y generar informes con los resultados de los cromatogramas obtenidos.
- Realizar tareas de verificación y diagnóstico del funcionamiento del equipo.
- Sintonizar el cromatógrafo para su calibrado y la adquisición de datos.



Figura 2.10 - *Fotografía del cromatógrafo HPLC modelo Agilent Series 1100.*

- **Viscosímetro**

Para la medida de la viscosidad se ha empleado un viscosímetro BROOKFIELD modelo LVT SYNCHRO-LECTRIC. Este equipo se completa con un microadaptador que permite termostatar la muestra mediante una camisa, a la que llega agua desde un baño termostático y en cuyo interior se introduce el usillo de medida. En el presente trabajo se ha utilizado el husillo clasificado con el N° 18. La medida del viscosímetro, presentada en un dial giratorio, depende del gradiente de velocidad aplicado y del tipo de husillo. De forma que para obtener la viscosidad aparente, en centipoises, hay que multiplicar el valor de la medida por un factor que depende del gradiente de velocidad aplicado. En la Tabla 2.6 se recogen los factores de conversión del husillo utilizado.

Tabla 2.6 – *Relación entre el gradiente de velocidad y el factor de conversión para el husillo N° 18.*

γ (s^{-1})	3,96	7,92	15,8	39,6	79,2
Factor de conversión	10	5	2,5	1	0,5

2.2.3. Equipos auxiliares

- **Autoclave**

La esterilización de todos los materiales, medios empleados y el biorreactor se realizó en un autoclave de la marca SELECTA, modelo Presoclave II 80. Se trata de un modelo de autoclave vertical, con un intervalo de temperaturas de 115 a 134 °C, un intervalo de presión de 0,62 a 2 bar y capacidad de 80 L.

- **Cámara de flujo**

La manipulación de los microorganismos, medios y materiales estériles se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar vertical marca TELSTAR, modelo Micro-V/PCR, capaz de alcanzar una velocidad de impulsión de 0,45 m/s y que permite trabajar en condiciones de esterilidad. Consta de un impulsor de aire y un filtro de tamaño de poro adecuado para evitar la entrada de otras bacterias. Dispone de una lámpara de luz ultravioleta para esterilizar el interior.

- **Sistema de purificación de agua**

El agua empleada en la preparación de medios ha sido previamente desionizada y su contenido en materia orgánica y contaminación biológica reducida a límites adecuados. Se utilizó un equipo de purificación de marca Sartorius, modelo Arium 611UV que permite obtener agua ASTM tipo I, de resistividad superior a 18,2 MW·cm a 25° C, carbono orgánico total menor de 1 ppb y contaminación bacteriana menor de 1 UFC/100 mL.

- **Ultracongelador**

Para la conservación a largo plazo de los *stocks* de microorganismo se utilizó un congelador de la marca SANYO, modelo VIP Series MDF-U33V. Se trata de un ultracongelador vertical de 334 L de capacidad, con un intervalo de temperaturas para la conservación de -50 a -86 °C.

- **Estufa de cultivo**

Para el cultivo del microorganismo en medio sólido, se utilizó una estufa de cultivo bacteriológica de convección natural de la marca HERAEUS, tipo B6. Este equipo permite regular la temperatura en su interior en un intervalo de 5 a 70 °C.

- **Estufa de secado**

La estufa es de la firma SELECTA, modelo S-202 y cuenta con termómetro de referencia, termostato de regulación de la temperatura y termostato de seguridad. La temperatura se puede regular en un intervalo de 40 a 200 °C, con una estabilidad del 0,5 %.

- **Centrífuga**

Para la centrifugación de las muestras se ha utilizado una centrífuga de mesa refrigerada de la marca SIGMA, modelo 4-16K. Las características más importantes de este equipo son:

- Dispone de rotores intercambiables:
 - Rotor de botes 6x250 mL, con una velocidad máxima de giro de 9000 rpm.

- Accesorio para tubos 6x60 mL, con una velocidad máxima de giro de 9000 rpm.
- Rotor de tubos *Eppendorf* 30x1,5 mL, con una velocidad máxima de giro de 15000 rpm.
- Velocidad máxima de giro: 15.000 rpm.
- Intervalo de control de temperatura: -20 a 70 °C.

2.3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

En este apartado se van a describir los procedimientos experimentales y los métodos de análisis utilizados en el desarrollo de este trabajo.

2.3.1. Procedimientos experimentales

En este apartado se describen los protocolos experimentales desarrollados para la conservación, la manipulación y el cultivo del microorganismo hasta obtener un inóculo de células con un estado metabólico similar, así como el procedimiento para el cultivo en biorreactor, tanto para el estudio del crecimiento como para el estudio de la capacidad desulfurante.

2.3.1.1. Conservación del microorganismo

El Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) del C.S.I.C. proporcionó las cepas de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural, cada una sembrada en una placa de agar.

- A corto plazo: conservación de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

A partir de la placa de agar en la cual se recibió la cepa, luego de haber sido incubada por 24 horas a 30 °C, se transfiere un *loop* del cultivo de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 con un asa de siembra a placas con medio LB-Agar fresco. Estas placas son incubadas durante un periodo de 24 a 48 horas en estufa de incubación a 30 °C, manteniéndolas posteriormente a 4° C durante un período de 7 días como máximo. Tras ese tiempo, se renueva el cultivo traspasándolo a otra placa con medio LB-agar fresco.

- A largo plazo: conservación de *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural

El microorganismo se conserva por congelación en *stocks* concentrados. Para ello, desde la placa de agar en la cual se recibió la cepa, se incuba a 30 °C durante 24 h, con un asa de siembra, se traspasa a un matraz *Erlenmeyer* de 250 mL, con 50 mL de medio LB, un *loop* del microorganismo procedente de la placa de LB-Agar y se mantiene en incubadora orbital a 30 °C y 210 rpm hasta que el microorganismo alcanza la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento. Las células se separan del medio de cultivo por centrifugación durante 5 minutos a 9000 rpm. Se elimina el medio sobrenadante y se resuspenden en una disolución al 50 % de glicerina y suero salino (0,9 % NaCl). La solución se introduce en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL de capacidad, en volúmenes de 1mL a una concentración de 10 g/L y se conserva en congelador a -80 °C.

2.3.1.2. Preparación del inóculo

Dado que las células conservadas, siguiendo la metodología mencionada en el apartado anterior, se encuentran en estado de latencia, la preparación del inóculo se ha realizado en dos etapas consecutivas (preinóculo e inóculo) que permiten su adaptación al medio en el que se realizará el estudio, para establecer, así, unas condiciones metabólicas idóneas y reproducibles (Olmo, 2004; Martin, 2005).

- Preinóculo

En el caso de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, el preinóculo se prepara partiendo de una placa con medio sólido LB-Agar en la que se ha conservado el microorganismo a corto plazo. Con un asa de siembra se traspasa un *loop* del microorganismo procedente de la placa de LB-Agar a un matraz *Erlenmeyer* de 250 mL, con 50 mL de medio LB, y se mantiene en incubadora orbital a 30 °C y 210 rpm durante 24 horas.

En el caso de *Pseudomonas putida*, el preinóculo se prepara partiendo del *stock* congelado en el que se ha conservado el microorganismo a largo plazo. En matraces *Erlenmeyer* de 250 mL, con 50 mL de medio LB y 250 µL de tetraciclina (únicamente para *Pseudomonas putida* KTH2), se inocula el volumen necesario del *stock* (atemperado previamente) para lograr una concentración inicial del microorganismo de 0,1 g/L. Los matraces se mantienen a 30 °C y 210 rpm en incubadora orbital durante 12 horas.

○ Inoculo

El inóculo se prepara mediante un segundo crecimiento del microorganismo en medio líquido LB, a partir del preinóculo que ha alcanzado previamente la fase exponencial de crecimiento. Este cultivo es luego empleado como inóculo para los experimentos de crecimiento llevados a cabo en fermentador.

En el caso de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se inocula, en matraces *Erlenmeyer* con 50 mL de medio LB, el volumen de preinóculo necesario para una concentración inicial del microorganismo de 0,15 g/L. El inóculo se incuba en las mismas condiciones que el preinóculo durante 10 horas.

En el caso de *Pseudomonas putida*, se introduce el volumen de preinóculo necesario para tener una concentración inicial del microorganismo de 0,1 g/L en matraces *Erlenmeyer* con 50 mL de medio LB. El inóculo se incuba en las mismas condiciones que el preinóculo durante 4 horas. En la Figura 2.11 se muestra el esquema del procedimiento.

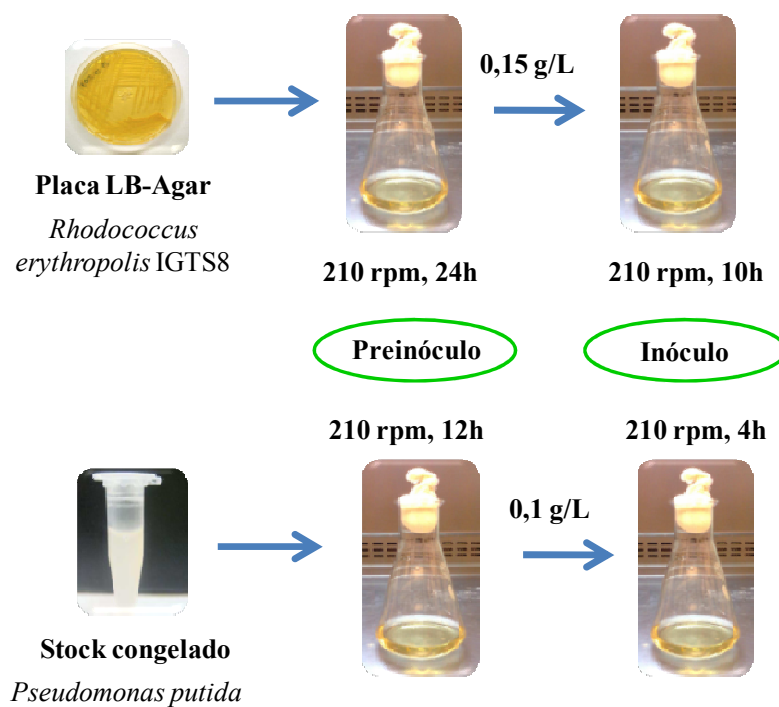


Figura 2.11 - Esquema del procedimiento experimental para el proceso de preparación del inóculo.

2.3.1.3. Cultivo del microorganismo en biorreactor

Una vez obtenido el inóculo del microorganismo, formado por células en similar estado metabólico, se procede al crecimiento controlado en medio sintético BSM.

- Cultivo de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

En condiciones de esterilidad, se introducen 200 mL de inóculo en un biorreactor de 2 L con 1,8 L de medio BSM para *R. erythropolis* IGTS8, para una concentración inicial de microorganismo de 0,15 g/L. A lo largo del crecimiento se registra en línea la evolución del pH, la temperatura, la agitación y el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio líquido mediante el software MFCS/WIN 3.0.

Las condiciones de operación son las siguientes: temperatura de 30 °C, agitación desde 100 rpm hasta 700 rpm, caudal de aire de 1 a 10 L/min (0,5 a 5 vvm), y porcentaje de saturación de oxígeno inicial 100 %.

A lo largo del crecimiento se extraen muestras del biorreactor en condiciones de esterilidad. Una pequeña cantidad del volumen de las mismas se utiliza para analizar la biomasa, mientras que el resto del volumen se centrifuga a 9000 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugada la muestra, se desecha el sobrenadante (caldo) y el *pellet* (células) se resuspende en el volumen adecuado de una disolución al 50 % de glicerina y suero salino (9 g/L de NaCl) para obtener una concentración de biomasa de 10 g/L. Las células resuspendidas se conservan a -18 °C en tubos tipo *falcon* y constituyen el biocatalizador para los ensayos de biodesulfuración (Figura 2.12). Los ensayos de biodesulfuración son realizados 24 horas después de haber sido obtenidas las células.

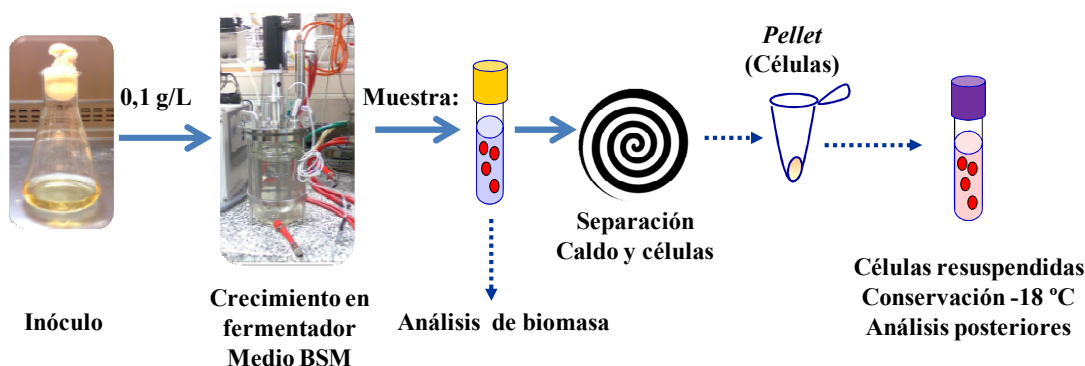


Figura 2.12 - Esquema del procedimiento experimental para el cultivo de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en biorreactor.

○ Cultivo de *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural

En condiciones de esterilidad, se introduce la cantidad necesaria de inóculo en un biorreactor de 2 L teniendo en cuenta que se han hecho experimentos con 1,8 L y con 1 L de medio BSM para *P. putida* KTH2 y *P. putida* natural respectivamente, para una concentración inicial de 0,10 g/L. A lo largo del crecimiento se registra en línea la evolución del pH, la temperatura, la agitación y el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio líquido mediante el software MFCS/WIN 3.0.

Las condiciones de operación son las siguientes: temperatura de 30 °C, agitación desde 100 rpm hasta 2000 rpm y porcentaje de saturación de oxígeno inicial 100 %. Se ha hecho uso de tabiques deflectores y de un disco rompe-espuma.

A lo largo del crecimiento se extraen muestras del biorreactor en condiciones de esterilidad:

a) En el caso de *P. putida* KTH2, una vez extraída la muestra, una cantidad del volumen es utilizada para analizar la biomasa, mientras que el resto del volumen de la muestra extraída se centrifuga a 9000 rpm durante 5 minutos, como queda reflejado en la Figura 2.13. Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante se conserva a -18 °C para el posterior análisis de la fuente de carbono y el *pellet* se resuspende en el volumen adecuado de una disolución al 50 % de glicerina y suero salino (9 g/L de NaCl), para obtener una concentración de biomasa de 10 g/L. Las células resuspendidas se conservan a -18 °C en tubos tipo *falcon* y constituyen el biocatalizador para los ensayos de biodesulfuración, que son realizados 24 horas después de haber sido obtenidas las células.

b) En el caso de *P. putida* natural, una vez extraída la muestra, una cantidad del volumen se utiliza para analizar la biomasa, mientras que el resto del volumen de la muestra extraída se centrifuga a 9000 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugada la muestra, el sobrenadante se conserva a -18 °C para el posterior análisis de la fuente de carbono (Figura 2.14). Como se mencionó previamente, *P. putida* natural no presenta capacidad desulfurante, por lo tanto, el *pellet* de células obtenido se desecha.

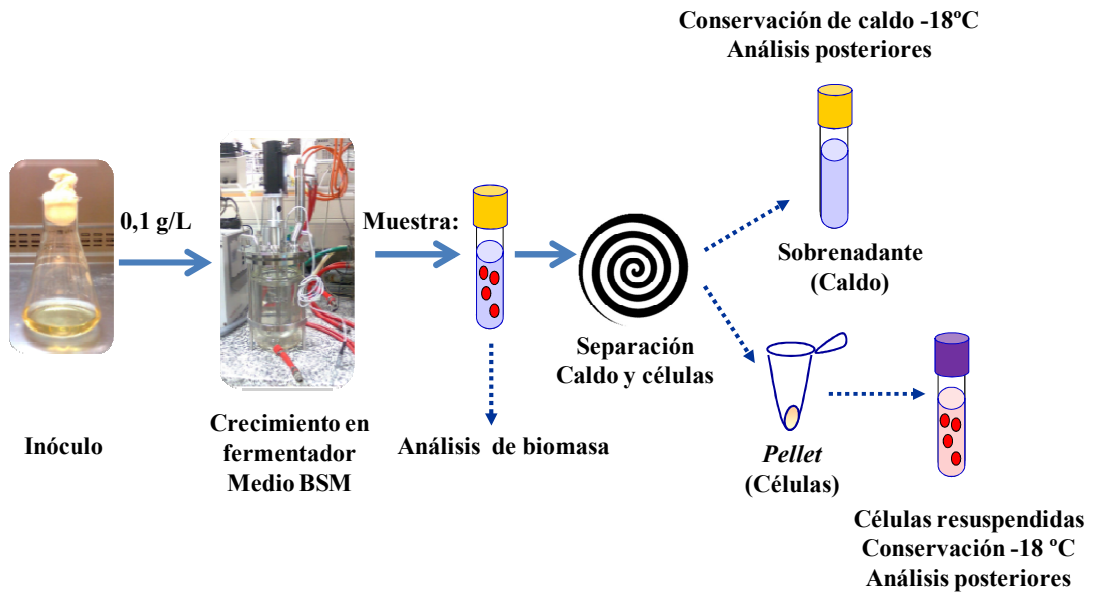


Figura 2.13 - Esquema del procedimiento experimental para el cultivo de *P. putida* KTH2 en biorreactor.

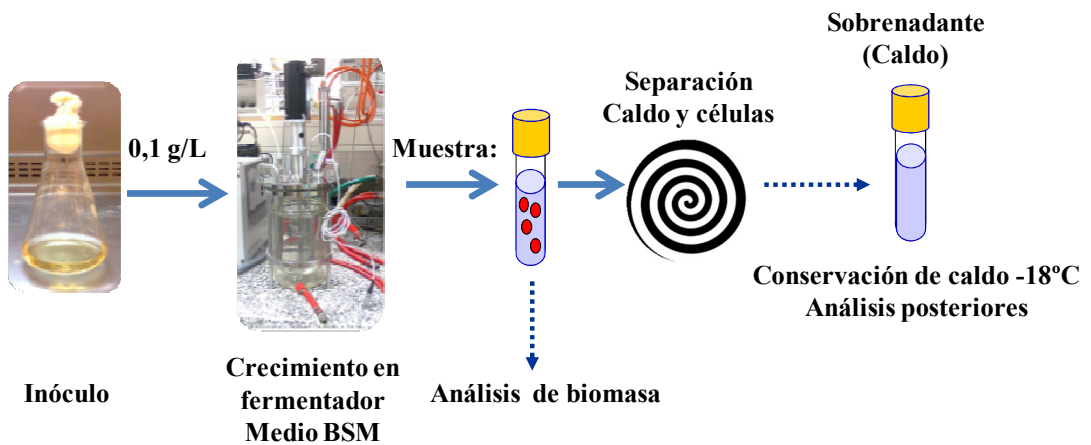


Figura 2.14 - Esquema del procedimiento experimental para el cultivo de *P. putida* natural en biorreactor.

2.3.1.4. Experimentos de biodesulfuración en *resting cells*

Para determinar la capacidad desulfurante desarrollada por el microorganismo a lo largo del crecimiento en las diferentes condiciones de trabajo, se ha empleado un procedimiento estándar con “células en reposo” (referido en literatura como *resting cells*). El medio empleado en estos experimentos no debe contener ningún nutriente que pueda ser empleado por las células para su crecimiento, y controlar el valor de pH en torno a un valor de 8, por lo que se ha emplea un tampón biológico HEPES.

Cada experimento se lleva a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 100 mL tapado con algodón y autoclavado. Se trabaja con 16 mL de HEPES sobre el que se añade, una vez el matraz está frío, el volumen necesario del sustrato azufrado empleado según el caso (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS) para disponer de la concentración inicial deseada. Durante el ensayo, los matraces se incuban en un baño termostatizado a 30 °C y con una agitación de 250 rpm. Para conocer la concentración de biomasa disponible en los tubos tipo *falcon* en los que se conserva el biocatalizador, se mide la absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-visible a 600 nm. De esta forma, se calcula el volumen que deberá inocularse para ajustar la concentración de biomasa o catalizador deseada en el *Erlenmeyer* para iniciar la desulfuración en *resting cells*.

La toma de muestras para el seguimiento de la biodesulfuración se realiza tomando alícuotas de 0,5 mL del medio de reacción y recogéndolos en tubos *Eppendorf* que contienen 0,5 mL de acetonitrilo. La función del acetonitrilo es detener la reacción y solubilizar los compuestos de la ruta 4S. Las muestras se conservan a -18 °C para su posterior análisis mediante cromatografía de HPLC.

En el caso de *R. erythropolis* IGTS8, se fija en todos los experimentos una concentración inicial de biomasa de 0,7 g/L. El compuesto de partida es DBT con una concentración inicial de 25 µM. El seguimiento de la desulfuración se realiza tomando muestras cada 15 ó 30 minutos, durante un tiempo de reacción total de 120 minutos.

En el caso de *P. putida* KTH2, se fija, en todos los experimentos, una concentración inicial de biomasa de 0,7 g/L. El compuesto de partida es DBT con una concentración inicial de 10 µM. El seguimiento de la desulfuración se realiza tomando muestras cada 15 ó 30 minutos, durante un tiempo de reacción total de 120 minutos.

2.3.1.5. Medida de las actividades enzimáticas

Con el fin de estudiar la actividad de las diferentes enzimas que participan en la ruta 4S (DszA, DszC y DszB), se han realizado ensayos en *resting cells* partiendo de los sustratos de cada una de las enzimas: DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS.

La actividad de cada una de las enzimas involucradas en esta ruta se ha definido como el valor de la derivada de la concentración del sustrato azufrado, referido a la concentración de biomasa del ensayo, y extrapolando a tiempo cero, es decir:

$$a_j = - \left. \frac{dC_j}{C_x \cdot dt} \right|_{t=0} \quad ,j = \text{DBT, DBTO, DBTO}_2, \text{HBPS} \quad [2.1]$$

El estudio de las actividades enzimáticas de la ruta 4S se ha realizado a partir de ensayos en *resting cells* con células obtenidas a diferentes tiempo de crecimiento y conservadas a -18 °C, empleando, individualmente, DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS como sustratos azufrados con una concentración inicial de 10 μM. El desarrollo de estos ensayos en *resting cells* es análogo al que se ha descrito en el apartado anterior.

Las curvas de consumo de cada sustrato se ajustaron a una función exponencial decreciente según se recoge en la ecuación [2.2], para luego calcular la derivada con el tiempo y extrapolar a tiempo cero.

$$C_j = a + b \cdot \exp(-t/c) \quad [2.2]$$

Las características particulares de *P. putida* KTH2 permiten realizar la medida de las actividades enzimáticas intracelulares a partir de los datos obtenidos en el caldo de cultivo directamente, es decir, *in vivo*. Se sabe, por trabajos anteriores, que ninguno de los compuestos implicados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) experimentan limitaciones a su transporte a través de la membrana celular del microorganismo (Alcon y col., 2005). Asimismo, se conoce que las concentraciones de equivalentes reducidos y de poder reductor en la célula a lo largo de la curva de crecimiento de *P. putida* KTH2 no afecta a la capacidad desulfurante del biocatalizador (Alcon y col., 2005).

2.3.1.6. Medida de las velocidades de transporte (OTR) y consumo de oxígeno (OUR)

En un biorreactor, el balance de materia para el oxígeno disuelto en la fase líquida, supuesta una buena mezcla, se puede escribir de la siguiente forma:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \rightarrow \frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_x \quad [2.3]$$

El primer sumando del segundo miembro de la expresión se refiere al transporte de oxígeno, siendo $k_L a$ el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $C_{O_2}^*$ la concentración de saturación de oxígeno disuelto y C_{O_2} la concentración de oxígeno en cada momento. El segundo sumando se refiere al consumo de oxígeno por parte del microorganismo, siendo q_{O_2} la velocidad específica de consumo de oxígeno y C_x la concentración de biomasa en cada momento.

Así, numerosos métodos de medida de OUR y $k_L a$ hacen uso de esta ecuación en la determinación de estos parámetros. En este trabajo se han utilizado dos métodos de medida dependiendo de las condiciones del cultivo: el método dinámico y el método de “medida en proceso”.

- Método dinámico

El método de medida de la velocidad de consumo más utilizado por su sencillez y relativa exactitud es el **método dinámico** (Dussap y Gros, 1985; Yang y col., 1988; Gao y Lee, 1992; Rane y Sims, 1994; Gomez, 1995, Garcia-Ochoa y col., 2000; Garcia-Ochoa y Gomez., 2010).

El **método dinámico clásico** consiste en registrar los valores de oxígeno disuelto durante la interrupción de la aireación del caldo de cultivo durante un cierto tiempo (ver Figura 2.15). En estas condiciones de ausencia de aire, el primer término de la Ec. [2.3] se hace cero, reduciéndose a la Ec. [2.4]. Durante el intervalo de tiempo que se suspende la aireación para registrar los valores de concentración de oxígeno disuelto; esta concentración se debe mantener por encima del 10 % del valor de saturación, valor sensiblemente superior a la concentración crítica para este microorganismo (Gomez y col., 2006b).

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = -q_{O_2} \cdot C_x = -OUR_d \quad [2.4]$$

Mediante una regresión lineal de los valores de la concentración de oxígeno disuelto frente a los valores del tiempo se puede determinar el valor de OUR (pendiente de la recta). El valor de q_{O_2} se determina dividiendo OUR por la biomasa medida para cada momento a lo largo del crecimiento.

De esta manera, antes de llegar al valor crítico de concentración de oxígeno disuelto, se restablece el caudal de aire en el biorreactor. La concentración de oxígeno en el medio aumenta y, conocido OUR, se puede determinar $k_L a$, integrando la ecuación [2.3]. Este procedimiento se puede repetir, realizándolo para distintas condiciones de agitación o aireación, dependiendo de la variable que se esté estudiando en cada experimento.

A lo largo de cada uno de los experimentos se toman muestras para conocer la concentración de biomasa presente en el medio, y así poder determinar posteriormente el consumo específico de oxígeno. Con el fin de que los experimentos realizados en cada etapa no influyan en las posteriores medidas de la OUR se han llevado a cabo crecimientos independientes para cada medida.

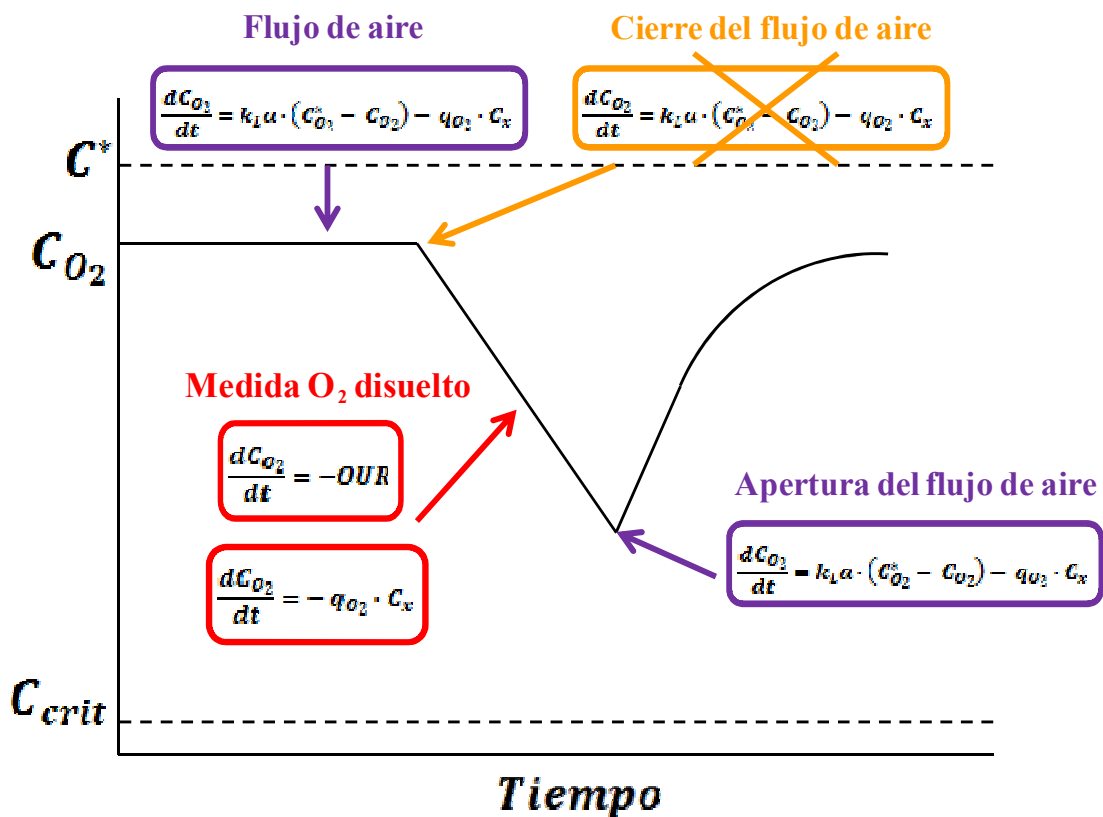


Figura 2.15 - Método dinámico clásico para la determinación de OUR y q_{O_2} (García-Ochoa y Gómez, 2009).

El *método dinámico físico* empleado para la determinación de $k_L a$, se basa en la medida de la concentración de oxígeno disuelto durante la absorción (o desorción) de oxígeno con nitrógeno de la disolución en ausencia de transformación microbiana, utilizando la respuesta de un electrodo de oxígeno a los cambios en la concentración de este gas en el medio, en condiciones no estacionarias o dinámicas. Dentro de estas condiciones, el término correspondiente al consumo de oxígeno, $q_{O_2} \cdot C_x$, de la Ecuación [2.3], es cero (Garcia-Ochoa y Gomez, 2009).

○ Método de medida de OUR en proceso

En cultivos de *Pseudomonas putida*, debido a las dificultades de aplicación del método anterior, como consecuencia del rápido descenso de la concentración de oxígeno, debido al elevado valor de OUR (Gomez y col., 2006a), se ha aplicado el método de “medida en proceso” (Santos y col., 2006), a partir de la variación del oxígeno disuelto durante el crecimiento $\left(\frac{dC_{O_2}}{dt}\right)_p$ y de la velocidad de transporte de oxígeno (OTR), reorganizando la Ec. [2.3], se obtiene:

$$OUR_p = q_{O_2} \cdot C_x = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{dC_{O_2}}{dt}\right)_p \quad [2.5]$$

Así, conocida la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo, se puede determinar OUR y, conocida la concentración de biomasa celular (C_x), el valor de q_{O_2} . Para la aplicación de este método es necesario conocer OTR a través de la estimación de $k_L a$. Para esto último, se ha utilizado un modelo predictivo desarrollado por este equipo de investigación (Garcia-Ochoa y Gomez 2004; Garcia-Ochoa y Gomez 2005; Garcia-Ochoa y Gomez., 2009; Santos y col., 2006), que se describe más adelante.

2.3.2. Métodos de análisis

Durante el cultivo de los microorganismos y el seguimiento de los ensayos de estrés hidrodinámico, se emplearon los métodos analíticos que se describen a continuación.

2.3.2.1. Análisis de la biomasa

Para realizar el seguimiento del crecimiento del microorganismo se utilizó un método de análisis óptico, de espectrofotometría de absorción, para relacionar la concentración de biomasa con la medida de la absorbancia del caldo. Esto se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro. El calibrado se realizó cultivando el microorganismo en el medio complejo LB, utilizando *Erlenmeyers* en una incubadora orbital a 210 rpm y 30 °C, hasta que se alcanza una densidad óptica suficientemente elevada; las muestras se centrifugan y la biomasa se lleva a peso seco hasta un valor constante. Paralelamente, se realizan diluciones del caldo con el fin de medir la absorbancia de cada una de las muestras; de esta forma, se obtienen pares de valores concentración de biomasa-absorbancia, que se ajustaron, mediante regresión lineal, a una expresión de tipo Lambert-Beer:

$$C_x = F_c \cdot Abs \cdot d \quad [2.6]$$

donde F_c es el factor de calibrado, usando agua destilada como blanco; Abs , la absorbancia y d , el factor de dilución. Los factores de calibrado, F_c , obtenidos para *R. erythropolis* IGTS8, *P. putida* KTH2 y *P. putida* natural son 0,26; 0,621 y 0,591; respectivamente.

La relación entre la concentración de biomasa y la absorbancia mantiene la linealidad entre valores de 0,1 y 0,9 unidades de absorbancia. En el caso de que el valor de absorbancia de una muestra tomada durante el crecimiento en el medio de cultivo superase el extremo superior del intervalo de linealidad del calibrado, se diluye con agua destilada, de modo que la absorbancia medida se encuentre en la región lineal del calibrado. Se ha comprobado la validez de esta medida en medio BSM para muestras tomadas del biorreactor. En la Figura 2.16 se muestran los resultados obtenidos para el calibrado de *R. erythropolis* IGTS8, *P. putida* KTH2 y *P. putida* natural, respectivamente.

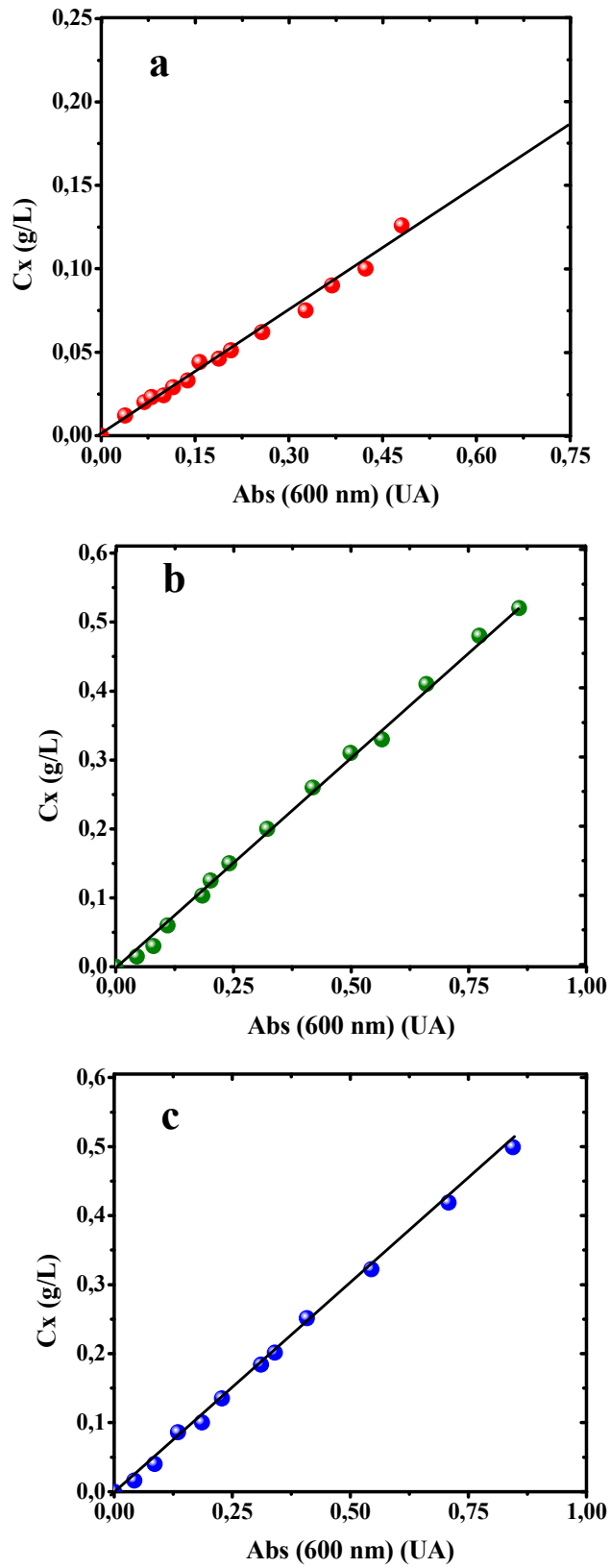


Figura 2.16 - Recta de calibrado para la relación de concentración de biomasa y absorbancia en peso seco a 600 nm para *R. erythropolis* IGTS8 (a), *P. putida* KTH2 (b) y *P. putida* natural (c).

2.3.2.2. Medida de la concentración de glicerol y de ácido glutámico

Para el seguimiento del consumo de glicerol durante el crecimiento de *P. putida*, se ha empleado un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo de HPLC utilizado es el descrito anteriormente.

Las condiciones y características del método de análisis son las siguientes:

- Columna: Rezex ROA – Organic Acid H+ (8 %). Tamaño: 300 x 7,8 mm
- Fase móvil: disolución acuosa de ácido sulfúrico $5 \cdot 10^{-3}$ M. Caudal: 0,5 mL/min
- Volumen de inyección: 15 μ L
- Detector: índice de refracción de array (RID)
- Tiempo de retención: 17 min

La ecuación de calibrado obtenida al relacionar la concentración de glicerol, (C_G), con el área, A, del cromatograma queda recogida en la Ec. [2.7].

$$C_G = 4,68 \times 10^{-6} \cdot A \quad [2.7]$$

Para el seguimiento del consumo de glicerol durante el crecimiento, se toman 0,5 mL del sobrenadante obtenido de las muestras y conservadas a -18 °C y se añaden a un vial de HPLC para su análisis. El caldo es diluido apropiadamente con el fin de que los valores de área entren dentro del intervalo de calibrado.

Para la medida de ácido glutámico durante el crecimiento del microorganismo se ha empleado también un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El equipo de HPLC utilizado es el descrito anteriormente.

Las condiciones y características del método de análisis son las siguientes:

- Columna: Develosil 60. Diámetro de partícula: 3 μ m. Tamaño: 150 x 4,6 mm
Fase móvil: mezcla de una disolución de K_2HPO_4 2,5 μ M con pH 2,85 y acetonitrilo en relación 25:75. Caudal: 0,2 mL/min
- Volumen de inyección: 5 μ L
- Detector: UV-diodo de array. Longitud de onda: 206 nm
- Tiempo de retención: 22 min

La ecuación de calibrado obtenida al poner en relación la concentración de ácido glutámico, (C_{AG}), con el área, A , del cromatograma queda recogida en la Ec. [2.8].

$$C_{AG} = 0,0015 \cdot A \quad [2.8]$$

Del sobrenadante conservado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ obtenido de las muestras que previamente han sido tomadas en los experimentos a lo largo del crecimiento, se toman 0,2 mL con una pipeta automática y se añaden a un vial de HPLC, donde se diluye con la misma disolución empleada para la fase móvil en una relación 50:50 para que posteriormente sea analizado.

2.3.2.3. Seguimiento de la capacidad desulfurante

Para el seguimiento de la capacidad desulfurante durante el crecimiento de los microorganismos, se analizaron los diferentes compuestos generados en la ruta 4S de desulfuración. Como ya se ha descrito anteriormente de acuerdo a la ruta 4S se realiza a partir del compuesto modelo a desulfurar, DBT, y a partir de él, y mediante la acción de las enzimas de la ruta, se convierte en los compuestos intermedios dibenzotiofeno-sulfoxido (DBTO), dibenzotiofeno-sulfona (DBTO₂), 2'-hidroxibifenil-bencenosulfonato (HBPS) y el producto final desulfurado, el 2-hidroxibifenil (HBP).

Para el análisis se empleó un método de HPLC. Las condiciones y características del método de análisis son las siguientes:

- Columna: Teknokroma® C18 (partícula: 5 μm). Tamaño: 150 x 4,6 mm.
- Fase móvil: acetonitrilo y agua ultrapura en relación 55:45. Caudal: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 60 μL
- Detector: UV-diodo de array

Las muestras que han sido tomadas previamente en los experimentos de biodesulfuración en *resting cells* y que son recogidas en tubos *Eppendorf*, son centrifugadas durante 10 minutos a 14000 rpm en una ultracentrífuga. Se toma 0,7 mL del sobrenadante con una pipeta automática y se añaden a un vial de HPLC, donde se acidifican con 75 μL de HCl 35 % por cada mL de muestra antes de analizarse.

Los picos de los compuestos de la ruta 4S se monitorizan a las longitudes de onda y tiempos de retención que aparecen en la Tabla 2.7. En la Figura 2.17 se muestra un cromatograma tipo. La relación entre la concentración de cada compuesto de la ruta

4S y el área de pico del cromatograma se muestra en las Figura 2.18 y 2.19. La ecuación obtenida a partir de las rectas de calibrado, es la siguiente:

$$C_j = F_{c,j} \cdot A_j \quad j = DBT, DBTO, DBTO_2, HBPS \quad [2.9]$$

Los factores de calibrado para cada compuesto de la ruta 4S se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 - *Tiempos de retención, longitudes de onda y factores de calibrado para la monitorización de los compuestos de la ruta 4S mediante HPLC.*

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (nm)	Factor de calibrado F_c
DBT	24,6	234	0,013
DBTO	3,3	220	0,035
DBTO ₂	5,3	234	0,016
HBPS	8,4	206	0,018
HBP	7,2	206	0,018

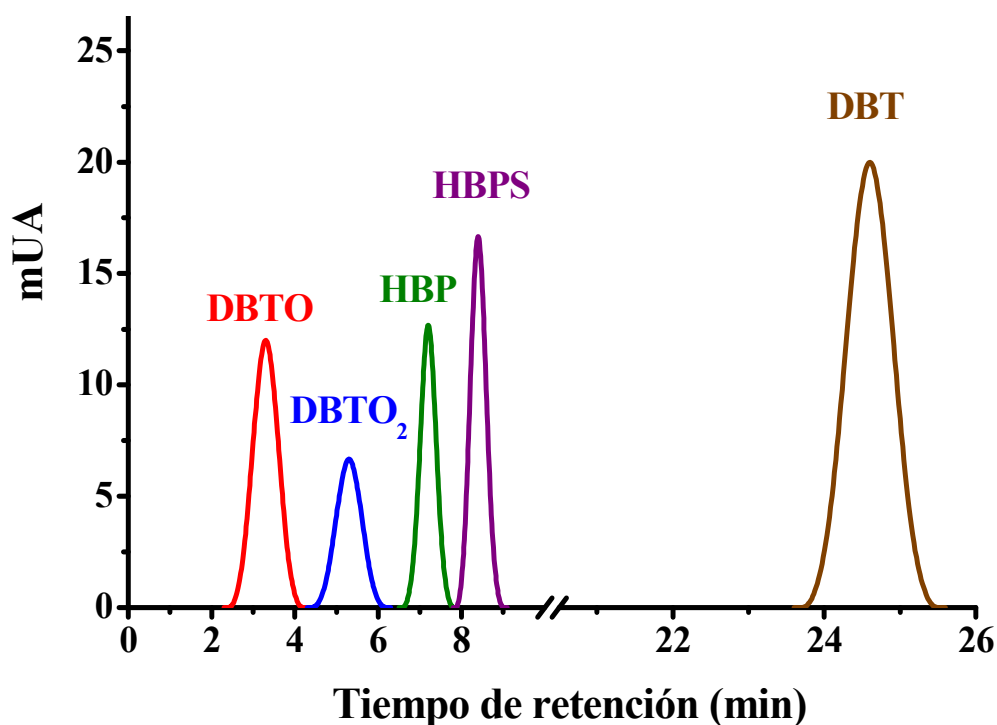


Figura 2.17 - *Cromatograma tipo obtenido por HPLC en el análisis de los compuestos de la ruta 4S.*

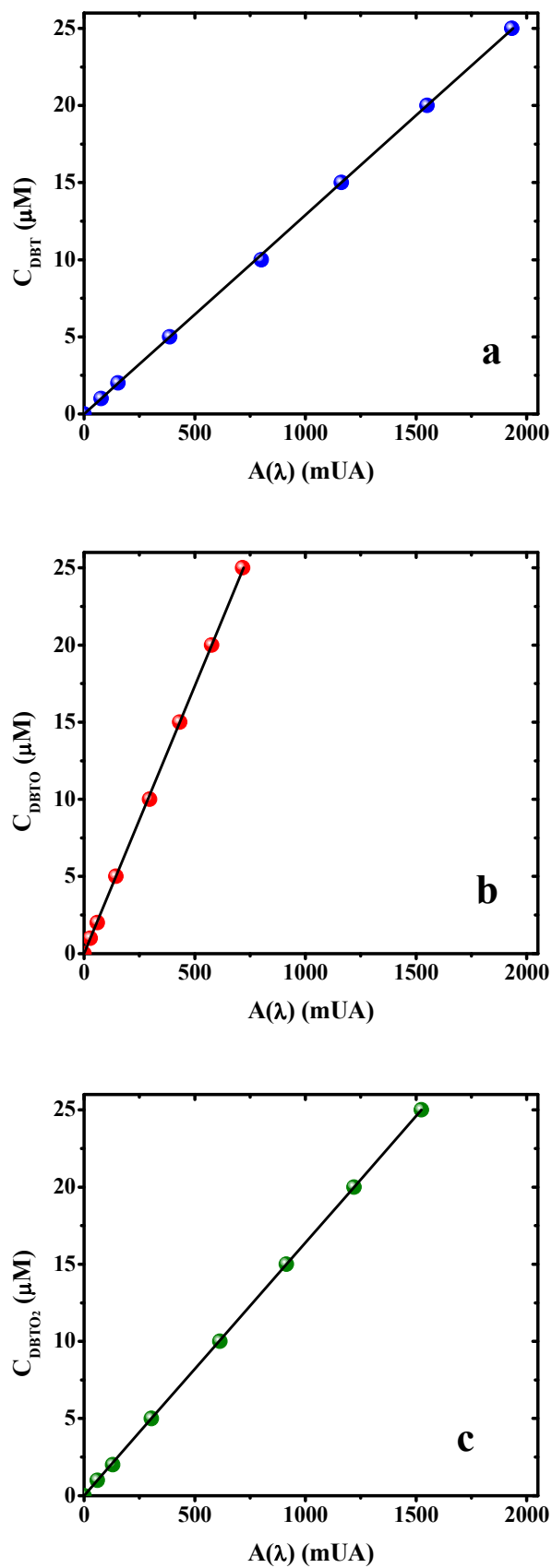


Figura 2.18 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de DBT (a), DBTO (b), DBTO_2 (c), con su correspondiente área de pico obtenida por HPLC.

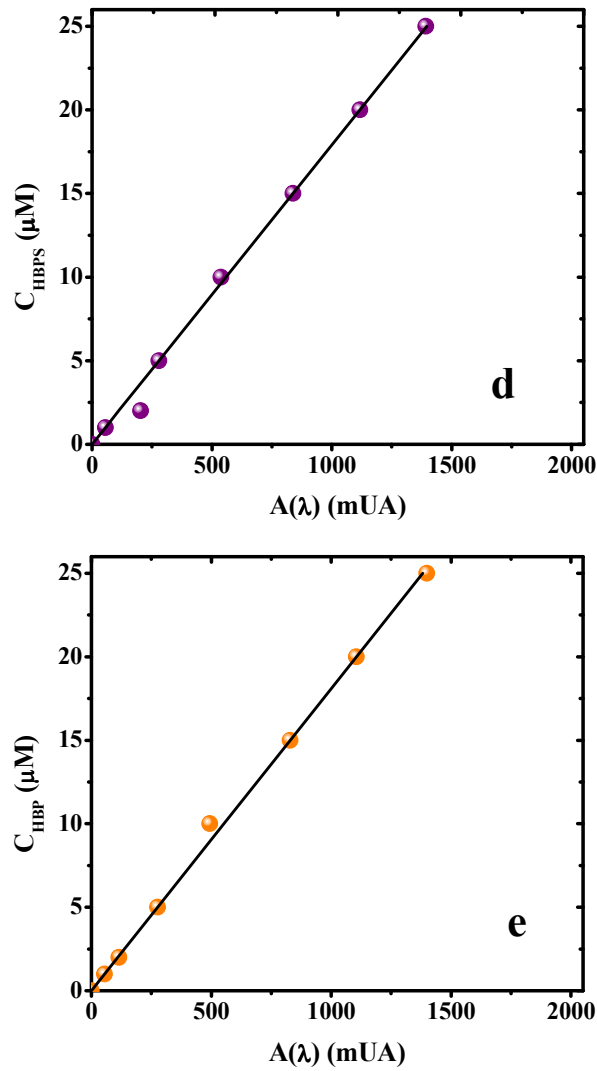


Figura 2.19 - Recta de calibrado que relaciona la concentración de HBPS (d) y HBP (e) con su correspondiente área de pico obtenida por HPLC.

2.4. MÉTODOS DE ESTIMACIÓN Y AJUSTE

2.4.1. Método de estimación de $k_L a$

A continuación se describe cómo se realiza la estimación del coeficiente de transporte, k_L , y el área interfacial específica, a .

El *coeficiente de transporte*, k_L , puede ser obtenido a través de la teoría de penetración de Higbie (Kawase y col., 1987; Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999), que está ampliamente aceptada para la descripción de la transferencia gas-líquido (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999;

Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Shimizu y col., 2000 y 2001; Garcia-Ochoa y Gomez, 2005).

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad [2.10]$$

El tiempo de exposición, t_e , se puede estimar a partir de la teoría de la turbulencia isotrópica de Kolmogoroff (1941). Lo que supone la teoría de Kolmogoroff es que el flujo turbulento se puede representar con el modelo de pequeños enjambres o torbellinos dentro de torbellinos mayores, albergados a su vez dentro de otros aún mayores. Kolmogoroff llegó a obtener la longitud de escala y la velocidad de escala para los enjambres más pequeños, de acuerdo a la relación entre dos parámetros característicos de los enjambres, tales como su longitud, η , y la velocidad de fluctuación, u . Ambos parámetros dependen de la velocidad de disipación de energía por unidad de materia, ε , y de la viscosidad cinemática, ν , de acuerdo a:

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} \quad [2.11]$$

$$u = (\nu \cdot \varepsilon)^{1/4} \quad [2.12]$$

De esta manera, si se considera el modelo reológico de Ostwald-de Waele para la descripción del comportamiento de fluidos no Newtonianos, adoptando la siguiente ecuación para el tiempo de exposición:

$$t_e = \left(\frac{k}{\varepsilon \cdot \rho}\right)^{\frac{1}{(1+n)}} \quad [2.13]$$

La ecuación [2.10] se puede escribir como:

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{D_L} \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho}{k}\right)^{\frac{1}{2 \cdot (1+n)}} \quad [2.14]$$

Como puede observarse, es necesario estimar la velocidad de disipación de energía, ε , cercana a la interfase, a fin de determinar k_L . Para ello, se asume que la energía en la interfase gas-líquido es consumida en el contacto entre los elementos del líquido y las burbujas de gas. La velocidad de disipación de energía por unidad de materia, en un tanque agitado, se puede aproximar a:

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{media} = \frac{P}{\rho(\pi/4)T^2h} \quad [2.15]$$

Para el cálculo de la potencia suministrada, P , en el caso de sistemas aireados, se puede utilizar la ecuación propuesta por Michel y Miller (1962):

$$P = \alpha \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad [2.16]$$

donde la potencia introducida por el agitador en el sistema no aireado, P_0 , determinada a partir del número adimensional de potencia, y las constantes α y β dependen de la configuración del sistema de agitación. Los valores de estas últimas para un sistema con dos turbinas Rushton son: $\alpha=1,224$ y $\beta=0,432$ (Abrardi y col., 1988).

La potencia suministrada, P_0 , se puede evaluar teniendo en cuenta que el número de potencia, N_p , puede considerarse constante en régimen turbulento ($Re > 10000$) y, por tanto, depende sólo del tipo de agitador y de la geometría según la expresión:

$$N_p = \frac{P_0}{\rho \cdot N^3 \cdot T^5} \quad [2.17]$$

El *área interfacial específica*, a , depende de las propiedades hidrodinámicas del reactor (de la fracción volumétrica de gas en el líquido, también llamada *hold-up* del gas, \emptyset , y del diámetro de burbuja, d_b), que a su vez son función de las propiedades físicas y de la geometría del sistema. Asumiendo burbujas esféricas, el área interfacial puede ser calculada a partir del tamaño medio de burbuja, y el *hold-up* del gas por la siguiente ecuación (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999):

$$a = \frac{6\emptyset}{d_b} \quad [2.18]$$

El *hold-up* del gas se puede estimar por la siguiente ecuación, obtenida por Kudrewizki and Rabe (1986), modificada para fluidos viscosos por Bhavaraju y col., (1978) y Kawase y Hashiguchi, (1996):

$$\frac{\emptyset}{1-\emptyset} = 0,819 \frac{V_s^{2/3} N^{2/5} T^{4/15}}{g^{1/3}} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{1/5} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-1/15} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{-1/4} \quad [2.19]$$

siendo μ_L la viscosidad para fluidos Newtonianos puros, aunque se puede utilizar la viscosidad aparente en el caso de fluidos no Newtonianos (García-Ochoa y Gómez 2005) y μ_G es la viscosidad del gas.

Por otro lado, el *diámetro de burbuja de medio* en sistemas viscosos se puede estimar de acuerdo a la siguiente ecuación (Bhavaraju y col., 1978):

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{0,6}}{\left(\frac{P}{V}\right)^{0,4} \cdot \rho_L^{0,2}} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G}\right)^{0,1} \quad [2.20]$$

En la Figura 2.20 se muestra un esquema de la estimación de $k_L a$ y en la Tabla 2.8 se resumen los valores de las propiedades físicas, parámetros geométricos y condiciones de operación utilizados en la predicción de k_L y a (Gomez y col., 2006a y 2006b).

Tabla 2.8 - *Valores de las propiedades físicas y de las condiciones de operación usadas en la estimación teórica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.*

Propiedades físicas	D_L (m ² /s)	$2,0 \cdot 10^{-9}$
	μ_L (kg/m·s)	$1,5 \cdot 2 \cdot 10^{-3}$
	μ_G (kg/m·s)	$2 \cdot 10^{-5}$
	σ (N/m)	0,045
	ρ_L (kg/m ³)	1100
	ρ_G (kg/m ³)	1,18
	σ (N/m)	0,05
Parámetros geométricos	T (m)	0,054
	D (m)	0,13
Condiciones de operación	V_s (m/s)	$1,25 \cdot 12,5 \cdot 10^{-3}$
	N (rpm)	100-2000
	N_p (-)	9

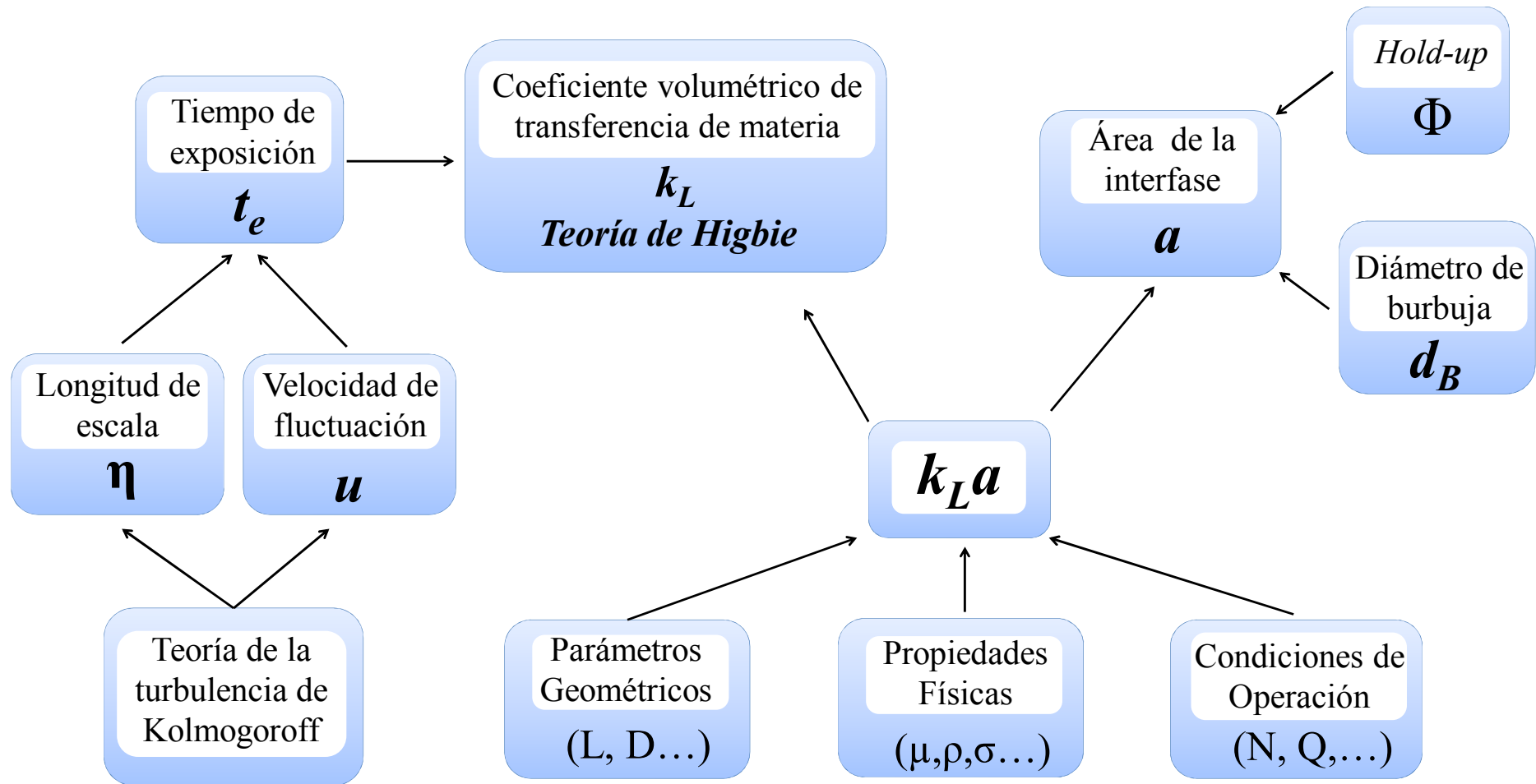


Figura 2.20 - Esquema de estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$.

2.4.2. Métodos matemáticos de ajuste

En el proceso de obtención de las ecuaciones de calibrado y en la obtención de los parámetros cinéticos de los modelos propuestos en la presente Memoria, los parámetros de los modelos han sido obtenidos mediante ajuste a los datos experimentales.

En la obtención de las ecuaciones de calibrado se ha utilizado un método de regresión lineal, siendo la función de ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot x \quad [2.21]$$

y el criterio de optimización, el de mínimos cuadrados:

$$\sum_{i=1}^N (y^{exp} - y^{teo})^2 \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.22]$$

En los casos en los que se ha empleado este tipo de regresión, para describir la calidad y grado de ajuste, entre una nube de puntos y una recta de regresión, se ha determinado el coeficiente de regresión, r.

En cuanto a los métodos de ajuste de los datos experimentales para obtener los parámetros de los modelos cinéticos, todos ellos han sido de tipo no lineal, que se detalla en el siguiente apartado y que presenta, como función objetivo, la minimización de la suma del cuadrado de los residuos (SRC), según la ecuación [2.23].

$$SRC = \frac{\sum_{j=1}^N w_j \cdot (C_{x,i}^{exp} - C_{x,i}^{teo})_j^2}{N} \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.23]$$

Siendo N la población estudiada, w_j el factor de pesado de los residuos, C_x^{exp} los datos totales de las poblaciones obtenidos en la experimentación y $C_{x,i}^{teo}$ los datos obtenidos por el ajuste del programa.

La bondad del ajuste se determinó atendiendo a los siguientes parámetros estadísticos: F de *Fischer-Snedecor*, utilizada en el análisis de varianza de la distribución e indicativo del grado global de ajuste, y la SRC o suma de residuos al cuadrado (Ec. [2.23]), indicativo de la calidad en la reproducción de los datos experimentales. La comprobación de la bondad del ajuste, en lo referente a los parámetros estadísticos comentados, se realiza a partir de la comparación con los valores de los mismos tabulados para el 95% de confianza, según el número de

parámetros a calcular y el número de datos que se emplean en cada ajuste, es decir, el número de grados de libertad que existe en el ajuste que se realiza.

- **Programas empleados**

Para la realización de los ajustes se han empleado dos paquetes comerciales de software: Origin 8.0 y Aspen Custom Modeler®.

En el caso del paquete de software Origin 8.0, este programa se ha utilizado para llevar a cabo el ajuste, a la ecuación [2.2], de los los datos experimentales de concentración-tiempo de cada uno de los sustratos de las enzimas de la ruta 4S y realizar la determinación de las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S mediante derivación, según se describe en Apartado 2.3.1.5 del presente Capítulo.

En cuanto al paquete de software Aspen Custom Modeler®, se ha empleado tanto para los ajustes de regresión no lineal en simple respuesta como para los ajustes de regresión no lineal acoplada al algoritmo de integración numérica, siendo posible dentro de este software, elegir los algoritmos de cálculo para la realización de las determinaciones matemáticas necesarias. En lo referente al algoritmo de regresión no lineal, el denominado NL2SOL (Non-linear Least-Squares Solver) es el que se ha escogido para realizar los ajustes necesarios en cada caso. Se trata de un programa que emplea la suma de residuos al cuadrado como criterio de optimización, con una variación del algoritmo del método de Newton (Dennis y col., 1981). En cuanto al método numérico de integración, se ha empleado el método implícito de Euler con paso variable. Es una variación del método de Euler implícito (Gautschi, 1997), que goza de rapidez en la integración; poder variar el tamaño de paso permite mantener un control del error, menor gasto de recursos de cálculo en el ordenador y mayor precisión en los resultados. En la Figura 2.21 se muestra un esquema de las funciones seguidas por el programa Aspen Custom Modeler® para el tratamiento de datos experimentales.

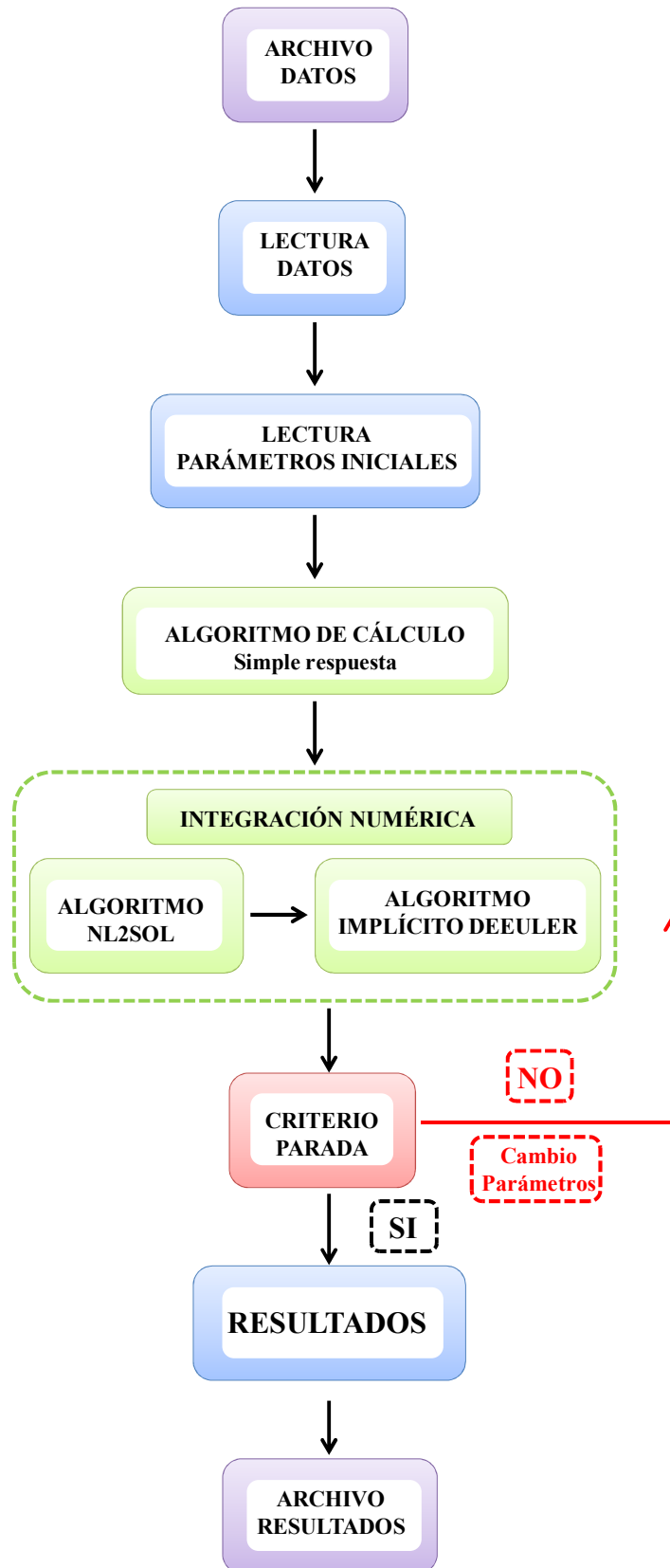


Figura 2.21 - Diagrama de flujo del programa de regresión no lineal en simple o múltiple respuesta para el tratamiento de datos experimentales con el software Aspen Custom Modeler®.

2.5. BIBLIOGRAFIA

Bhavaraju, S.M.; Russell, T.W.F y Blanch, H.W., **1978**. The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *AIChE. J.* **24**, 454-466.

Billet, R. y **Schultes**, M., **1993**. Predicting mass transfer in packed columns. *Chem. Eng. Technol.* **16**, 1-9.

Brenner, D.; Krieg, N. y Staley, J., **2005**. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2, The proteobacteria. Part B, The gamma proteobacteria, G. Garrity, Ed. Nueva York: Springer. 1134.

Dennis, J. E.; Gay, D. M. y Welsch, R. E., **1981**. Algorithm 573: NL2SOL-An Adaptive Nonlinear Least-Squares Algorithm, *ACM T. Mathlab Software.* **7**, 369-383.

Denis-Larose, C.; Labbe, D.; Bergeron, H.; Jones, A. M.; Gree, C.W.; Al-Hawari, J.; Grossman, M.J.; Sankey, B.M. y Lau, P.C.K., **1997**. Conservation of plasmidencoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2915-2919.

Denome, S.A.; Olson, E.S. y Young, K.D., **1993**. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2837-2843.

Denome, S.A.; Oldfield, C.; Nash, L.J. y Young, K., **1994**. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus sp.* strain IGTS8. *J. Bacteriol.* **176**, 6707-6716.

Dussap, C.G.; Decorps, J. y Gros, J. B., **1985**. Transfert d'oxygene en presence de polysaccharides exocellulaires dans un fermenteur agite aeré et dans un fermenteur de type gazosiphon. *Entropie.* **23**, 11-20.

Galan, B.; Diaz, E. y Garcia, J., **2000**. Enhancing desulfurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ. Microbiol.* **2**, 687-694.

Gallardo, M.; Ferrandez, A.; de Lorenzo, V.; Garcia, J. L. y Diez, E., **1997**. Designing recombinant *Pseudomonas* strains to enhance biodesulfurization. *J. Bacteriol.* **179**, 7156-7160.

- Gao, J. y Lee, J. M., 1992.** Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Biotechnol. Prog.* **8**, 285-290.
- Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E., 2004.** Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 2489-2501.
- Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E., 2005.** Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 771-772.
- Garcia-Ochoa, F. y Gomez E., 2009.** Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol. Adv.* **27**, 153-176.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. y Santos, V. E., 2000.** Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 680-690.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez E.; Santos, V.E. y Merchuk, J.C, 2010.** Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem. Eng. J.* **49**, 289-307.
- Gautschi, W., 1997.** Numerical Analysis: An Introduction. Boston: Birkhäuser. 507
- Gomez, E., 1995.** Transferencia de oxígeno en biorreactores tipo tanque agitado: Aplicación a la producción de xantano. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., 2006a.** Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy fuels.* **20**, 1565-1571.
- Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., 2006b.** Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability, *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.
- Gray, K. A.; Pogrebinsky, O. S.; Mrachko, G. T.; Xi, L.; Monticello, D. J. y Squires, D. J., 1996.** Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels, *Nat. Biotechnol.* **14**, 1705-1709.

Kawase, Y.; Halard, B.; Moo-Young, M., **1987**. Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. Sci.* **42**, 1609-1617.

Kawase, Y. y **Hashiguchi, N.**, **1996**. Gas-liquid mass transfer in external-loop airlift columns with Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* **62**, 35-42.

Kudrewizki, F. y **Rabe, P.**, **1986**. Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chem. Eng. Sci.* **41**, 2247-2252.

Li, M.Z.; Squires, C.H. y Childs, J.D., **1996**. Genetic analyses of the dsz promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *J. Bacteriol.* **178**, 6409-6418.

Martin, A.B., **2005**. Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT5279. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y Garcia-Ochoa, F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biotransformation for Different Media Compositions. *Energy Fuels.* **18**, 851-857

Matsubara, T.; Ohshiro, T.; Nishina, Y. e Izumi Y., **2001**. Purification, Characterization, and Overexpression of Flavin Reductase Involved in Dibenzothiophene Desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1179-1184.

Ohshiro, T.; Hine, Y. e Izumi, Y., **1994**. Enzymatic desulfurization of DBT by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 341-344.

Ohshiro, T.; Kanbayashi, Y.; Hine, Y. e Izumi, Y., **1995**. Involvement of flavin coenzyme in dibenzothiophene degrading enzyme system from *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1349-1351.

Oldfield, C.; Pogrebinsky, O.; Simmonds, J.; Olson, E. y Kulpa, C., **1997**. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology.* **143**, 2961-2973.

Olmo, C.H., 2004. Biodesulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Garcia-Ochoa, F., 2005. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Palleroni, N. J. y Doudoroff, M., 1972. Some Properties and Taxonomic Sub-Divisions of the Genus *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **10**, 73-100.

Piddington, C.S.; Kovavevich, B.R. y Rambosech, J., 1995. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 468-475.

Poblete-Castro, I.; Escapa, F.; Jäger, C.; Puchalka, J.; Chi Lam, C.M.; Schomburg, D.; Prieto, M.A. y Martins dos Santos, V., 2012. The metabolic response of *P. putida* KT2442 producing high levels of polyhydroxyalkanoate under single- and multiple-nutrient-limited growth: Highlights from a multi-level omics approach. *Microbial Cell Factories.* **11**, 34.

Rane, K.D. y Sims, K.A., 1994. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* T 1095. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 131-137.

Santos, V.E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F., 2006. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochem. Eng. J.* **32**, 198-204.

Shimizu, K.; Takada, S.; Minekawa, K. y Kawase, Y., 2000. Phenomenological model for bubble column reactors: prediction of gas hold-ups and volumetric mass transfer coefficients. *Chem. Eng. J.* **78**, 21-8.

Shimizu, K.; Takada, S.; Takahashi, T. y Kawase, Y., 2001. Phenomenological simulation model for gas hold-ups and volumetric mass transfer coefficients in external-loop airlift reactors. *Chem. Eng. J.* **84**, 599-603.

Tobajas, M.; Garcia-Calvo, E.; Siegel, M.H. y Apitz, S.E., **1999**. Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chem. Eng. Sci.* **54**, 5347-5354.

Xi, L.; Squires, C.H.; Monticello, D.J. y Childs, J.D., **1997**. A Flavin Reductase Stimulates DszA and DszC Proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 73-75.

Yang, X.M.; Mao, Z.X.; Yang, S.Z. y Mao, W.Y., **1988**. An improved method for determination of volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 1006-1009.

CAPÍTULO 3.
CRECIMIENTO DE *Rhodococcus*
***erythropolis* IGTS8**

CAPÍTULO 3

CRECIMIENTO DE *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, existen diversos microorganismos que desulfuran compuestos como benzotiofenos y dibenzotiofenos. Entre ellos destaca *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, una bacteria capaz de desulfurar dibenzotiofenos y sus derivados siguiendo la ruta 4S (Kilbane y Jackowski, 1992). De hecho, es la bacteria donde primero se encontró la citada ruta 4S, y es la cepa más ampliamente estudiada y utilizada en los procesos de biodesulfuración (BDS); fue patentada por el *Institute of Gas Technology* y comercializada por *Energy Biosystems Corporation* (Atlas, 1994).

Hay numerosos trabajos en la literatura para la producción de biocatalizadores capaces de llevar a cabo la ruta 4S (Kilbane y Jackowski, 1992), la mayoría utilizando dibenzotiofeno (DBT) como compuesto modelo (Kirimura y col., 2004; Martin y col., 2004 y 2005; Olmo y col., 2005a y 2005b; Calzada y col., 2009a y 2009b). Muchos de estos trabajos utilizan *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 en *resting cell* (Abbad-Andaloussi y col., 2003), forma de operar que resulta mucho más efectiva que la desulfuración durante el crecimiento (Ohshiro y col., 1996; Alcon y col., 2005). La operación en *resting cell* consiste en llevar a cabo primero el crecimiento de las células, durante el cual deben acumularse intracelularmente las enzimas que catalizan las cuatro reacciones de la ruta 4S (Figura 1.11, en el Apartado 1.4, pag. 49) y, posteriormente, se lleva a cabo la biodesulfuración (BDS) en unas condiciones en que no hay crecimiento (Nuhu, 2012; Alcon y col., 2005).

Entre los estudios previos sobre BDS realizados por el grupo de investigación utilizando *R. erythropolis*, con respecto a este trabajo, destaca el llevado a cabo por Olmo y col. (2005b), en el que se describe que el crecimiento y la capacidad de biodesulfuración se ven afectados por la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio y, por tanto, por las condiciones de operación que afectan al transporte de oxígeno en un tanque agitado: velocidad de agitación y caudal de aire, principalmente. Sin embargo, en dicho trabajo solo se describe que, efectivamente, dichas condiciones influyen, pero no se lleva a cabo un estudio profundo y específico del efecto que sobre el crecimiento o la capacidad de BDS tienen las condiciones fluidodinámicas en las que se realiza el cultivo. Este estudio profundo, que se realiza en el presente trabajo, permitirá conocer bajo qué condiciones de operación la velocidad de crecimiento de las células y su capacidad desulfurante están controladas o influenciadas por dichas condiciones.

Como se mencionó en la Introducción de la presente Memoria, uno de los aspectos que requiere especial atención en los cultivos sumergidos de bacterias reside en determinar el efecto que tienen las condiciones hidrodinámicas sobre las células. Es bien conocido que todos los cultivos llevados a cabo en biorreactores agitados mecánicamente están sometidos a las fuerzas asociadas a la fluidodinámica del medio líquido que las contiene, y esto puede afectar a la respuesta celular a diferentes niveles, modificando a veces su morfología (Märk y col., 1991; Dunlop y Namdev, 1993; Sahoo y col., 2003; McCloskey, 2011; Garcia-Ochoa y col., 2013a), a veces la velocidad de crecimiento (Sahoo y col., 2003; Yepes y Maugeri, 2005; Hodaifa y col., 2010; Garcia-Ochoa y col., 2013a), otras, las velocidades de producción (Çalik y col., 2004; Olmos y col., 2012; Garcia-Ochoa y col., 2013a) o de consumo de nutrientes (Prokop y Bajpai, 1992; Olmos y col., 2012), así como, en general, el metabolismo y las actividades de diferentes enzimas (Hewitt y col., 1998; Sahoo y col., 2003; Olmos y col., 2012). Las mencionadas respuestas biológicas son, frecuentemente, consideradas como parámetros de cuantificación de daño o estrés celular (Märk y Bronnenmeier, 1985; Trujillo-Roldan y Valdez-Cruz, 2006; Olmos y col., 2012; Garcia-Ochoa y col., 2013a).

En algunos de estos trabajos (Märk y Bronnenmeier, 1985; Prokop y Bajpai, 1992; Çalik y col., 2004; Garcia-Ochoa y col., 2013a) queda claramente establecido que existe una estrecha relación entre la respuesta fisiológica de los microorganismos y la hidrodinámica del biorreactor, que en tanques agitados está condicionada, además de por la geometría, principalmente por la agitación y el caudal de aireación. En

consecuencia, de acuerdo a la metodología propia de estas situaciones en Ingeniería Química, es interesante estudiar de forma independiente los fenómenos y efectos producidos en el cultivo al modificarse las condiciones de operación en el sistema. Esto es, estudiar los posibles efectos sobre las células de la hidrodinámica (fenómenos asociados a los gradientes de deformación generados en el flujo turbulento del medio de cultivo, es decir el cizallamiento al que pueden estar expuestas las células en el biorreactor), y los fenómenos relacionados con la mezcla o la transferencia de materia (principalmente de oxígeno, debido a la necesidad de transporte de dicho sustrato desde el aire al medio líquido). El conocimiento de estos fenómenos es de gran importancia en los bioprocesos, ya que son factores críticos en el diseño, el cambio de escala y la operación de los biorreactores.

En un medio de cultivo en el que los microorganismos están creciendo, las células consumen los nutrientes disueltos en el medio y los transforman en biomasa (Nielsen y Villadsen, 2003). Dicho crecimiento celular puede también ser considerado como un incremento en el número de individuos en la población, como resultado de la replicación y del cambio en el tamaño celular consecuencia de las reacciones bioquímicas que ocurren en el interior de la célula. La utilización de los nutrientes por las células, como la oxidación de la fuente de carbono y su posterior transformación en biomasa, en productos y en dióxido de carbono, sólo es posible con un aporte suficiente de oxígeno desde la fase gas a la fase líquida. Por tanto, en los bioprocesos aerobios es necesario proporcionar al microorganismo la cantidad de oxígeno suficiente para que éste satisfaga sus requerimientos metabólicos (García-Ochoa y col., 2010).

La concentración de oxígeno disuelto en el caldo, una suspensión de células respirando, cambia en función de la velocidad a la que se transfiere el oxígeno (*oxygen transfer rate*, OTR), y de la velocidad a la cual el microorganismo consume el oxígeno (*oxygen uptake rate*, OUR), cuya relación, cálculo o estimación ha sido tratada en trabajos anteriores (García-Ochoa y Gómez, 2009; García-Ochoa y col., 2010; García-Ochoa y col., 2013a).

Existen diversas formas para conseguir una OTR suficiente en los biorreactores, modificando, como ya se ha indicado, la velocidad de agitación, el caudal de aire o la concentración de oxígeno de la fase gas. En estas condiciones, la hidrodinámica y la energía introducida en el biorreactor pueden jugar un importante papel en la evolución

global del bioproceso. Esto es debido a que se promueven simultáneamente fenómenos de transferencia y de mezcla (mediante la aireación y la agitación se asegura una distribución homogénea de los nutrientes en el caldo de fermentación y favorece una adecuada transferencia de materia), pero también, las condiciones hidrodinámicas establecidas en el sistema, pueden tener influencia sobre las respuestas biológicas del microorganismo (velocidades de crecimiento, de producción y de consumo de nutrientes, cambios en la morfología, etc.), que en determinadas condiciones pueden afectar de una forma negativa al proceso (Henzler, 2000). La importancia relativa de estos fenómenos cambia con la escala o el tamaño, el tipo de biorreactor, las condiciones y forma de operación del proceso (García-Ochoa y col., 2010), el tipo de células (McCloskey, 2011) y los requerimientos del microorganismo (Sahoo y col., 2003). Con todo, los valores de la velocidad de agitación y/o del caudal de aireación a los que puede llevarse a cabo un determinado bioproceso están restringidos, debido a las limitaciones biológicas, ya que las células pueden verse afectadas por estrés hidrodinámico cuando las fuerzas mecánicas son demasiado vigorosas (García-Ochoa y col., 2013a; Olmos y col., 2012).

Teniendo en cuenta que el metabolismo de las células podría estar limitado por las condiciones de transporte o verse afectado por un posible estrés hidrodinámico (a la hora de optimizar la transferencia de oxígeno, por ejemplo), una mejor comprensión de este efecto sobre el crecimiento de *R. erythropolis* conduciría a un diseño más apropiado de los procesos de BDS y a un mejor conocimiento para el cambio de escala de este bioproceso.

Por tanto, el objeto de este capítulo es determinar la respuesta de los cultivos de *R. erythropolis* IGTS8 en diferentes condiciones hidrodinámicas, al cambiar la velocidad de agitación y/o la velocidad de aireación del biorreactor. De esta manera, a través de la medida del crecimiento de la biomasa y del consumo de oxígeno, aspectos tomados como respuesta de las células en función de las diferentes condiciones de operación establecidas para su cultivo, se pretende determinar si los cambios macroscópicos observados son debidos a fenómenos de transferencia de materia (principalmente de oxígeno) o a efectos hidrodinámicos como consecuencia de los fenómenos asociados a la fluidodinámica del biorreactor. En un capítulo posterior (Capítulo 5) de la presente Memoria, se estudiará de qué manera se ve influenciada la

capacidad de desulfuración, como parámetro de respuesta de la posible alteración metabólica.

3.1. CINÉTICA del CRECIMIENTO: VARIACIÓN de las CONCENTRACIONES de BIOMASA y de OXÍGENO DISUELTO

Con el fin de estudiar los aspectos antes citados, tratando de determinar una respuesta fisiológica indicativa de una situación de estrés, se han llevado a cabo diversos experimentos, cultivando células de *R. erythropolis* IGTS8 en operación discontinua en distintos equipos (matraz *Erlenmeyer* y biorreactor tipo tanque agitado). En dichos experimentos se ha estudiado la evolución de la concentración de biomasa y de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo, como magnitudes características del crecimiento. Posteriormente, se estudiará el consumo de oxígeno como posible indicador del estrés.

3.1.1. Resultados experimentales

Durante el cultivo se han fijado una serie de condiciones de operación (composición del medio, temperatura, etc.), previamente estudiadas y optimizadas en trabajos llevados a cabo por el grupo de investigación FQPIMA (Olmo y col., 2005a y 2005b; Santos y col., 2006), que se han descrito en el Capítulo 2 de esta Memoria. Estos trabajos previos han permitido la optimización del medio de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8, así como de las condiciones de operación necesarias para maximizar la cantidad de biomasa producida y/o la capacidad desulfurante (Olmo y col., 2005a y 2005b). Por ello, se ha obtenido el inóculo del biorreactor en dos etapas, creciendo las células, primero, en incubadora (preinóculo e inóculo), antes de cultivar las células en biorreactor, obteniéndose resultados experimentales reproducibles y una fase *lag* o de adaptación corta, gracias a lo cual se alcanza una mayor concentración de biomasa final en un menor tiempo de crecimiento.

Para establecer diferentes condiciones hidrodinámicas en el biorreactor, se ha modificado la velocidad de agitación, entre 100 y 700 rpm, y el caudal de aire, desde 1 a 10 L/min. En la Tabla 3.1 se muestran, de forma resumida, los experimentos realizados y las condiciones de operación utilizadas en cada uno de ellos. Para el cultivo de las

células en fermentador, se ha empleado un volumen de líquido útil de 2 L. Asimismo, durante el crecimiento se ha registrado en línea la evolución del pH, la temperatura, la agitación, el caudal de aire y el porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo, tal y como ha sido descrito en el Apartado 2.3.1.3 de la presente Memoria. Para el cultivo de las células llevado a cabo en incubadora, se han empleado matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio líquido. En todos los casos, el medio de crecimiento ha sido el descrito en el Apartado 2.1.3 y la temperatura se ha mantenido en 30 °C. Además, se han extraído muestras del biorreactor y de los matraces *Erlenmeyer* en condiciones de esterilidad para el análisis de biomasa.

En las Tablas 3.2 y 3.3 se recogen los resultados experimentales de la evolución de la concentración de biomasa celular con el tiempo, obtenidos en los cultivos de *R. erythropolis IGTS8* bajo las condiciones de operación descritas en la Tabla 3.1. Asimismo, los valores experimentales de la evolución que sigue la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del crecimiento para las diferentes condiciones de operación en las que se cultivó *R. erythropolis IGTS8* se muestran en las Tablas 3.4 a 3.10.

Tabla 3.1 - *Condiciones hidrodinámicas estudiadas en el cultivo de R. erythropolis IGTS8 en biorreactor de tipo tanque agitado.*

Experimento	Velocidad de agitación (rpm)	Caudal de aire (L/min)
R1	100	2
R2	150	2
R3	250	2
R4	350	2
R5	400	2
R6	450	2
R7	500	2
R8	550	2
R9	700	2
R10 (Incubadora)	210	--
R11	250	1
R12	250	2
R13	250	3
R14	250	4
R15	250	5
R16	250	6
R17	250	7

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

R18	250	8
R19	250	9
R20	250	10

Tabla 3.2 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con la velocidad de agitación.

Tiempo (h)	Concentración celular, Cx (g/L)									
	Código de Experimento									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
0	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,11	0,14
2	0,19	0,18	0,22	0,24	0,16	0,23	0,16	0,15	0,14	0,21
4	0,26	0,28	0,28	0,32	0,26	0,29	0,24			0,29
5								0,26	0,20	
6	0,32	0,38	0,45	0,45	0,44	0,39	0,36			0,45
7								0,40	0,25	
8	0,48	0,52	0,54	0,57	0,56	0,54	0,51			0,52
10	0,55	0,67	0,73	0,76	0,8	0,82	0,7	0,53	0,35	0,81
12	0,70	0,86	0,96	0,99	1,02	1,06	0,91	0,68	0,45	0,92
13	0,81	1,00	1,10	1,14		1,21				
14		1,09	1,20	1,25	1,28	1,32	1,10	0,84	0,54	1,09
16	1,00	1,23	1,37	1,42	1,45	1,47	1,27	0,99	0,63	1,41
18	1,10	1,34	1,47	1,51	1,58	1,61	1,41			1,51
19	1,12	1,37	1,54	1,60	1,62	1,65	1,46	1,19	0,73	
20	1,15	1,40	1,58	1,64		1,73				1,63
22	1,20	1,44	1,64	1,69	1,71	1,73	1,57	1,30	0,79	1,67
24	1,23	1,49	1,76	1,73	1,75	1,76	1,62	1,40	0,83	1,57

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.3 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con el caudal de aire.

Concentración celular, Cx (g/L)										
Tiempo (h)	Código de Experimento									
	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20
0	0,14	0,14	0,13	0,14	0,12	0,14	0,14	0,13	0,13	0,14
2	0,24	0,23	0,23	0,24	0,22	0,22	0,23	0,22	0,23	0,21
4	0,33	0,27	0,31	0,31	0,27	0,29	0,29	0,25	0,30	0,29
6	0,48	0,46	0,49	0,42	0,45	0,43	0,47	0,43	0,37	0,40
8	0,59	0,55	0,63	0,56	0,61	0,58	0,54	0,55	0,57	0,52
10	0,69	0,72	0,74	0,74	0,73	0,76	0,79	0,78	0,77	0,78
12	0,98	0,95	0,99	0,96	0,94	0,97	1,00	1,01	1,00	0,92
14	1,14	1,15	1,17	1,21	1,11	1,15	1,18	1,14	1,16	1,09
16	1,45	1,37	1,40	1,32	1,42	1,41	1,36	1,34	1,42	1,41
18	1,41	1,47	1,53	1,48	1,43	1,49	1,55	1,50	1,45	1,51
19	1,53	1,59	1,64	1,60	1,54	1,61	1,66	1,62	1,56	1,63
20	1,58	1,59	1,61	1,62	1,64	1,57	1,52	1,55	1,64	1,67
22	1,71	1,62	1,68	1,73	1,60	1,65	1,69	1,64	1,67	1,57
24	1,69	1,76	1,83	1,75	1,68	1,75	1,81	1,74	1,66	1,73

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.4 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con la velocidad de agitación para los experimentos R1 a R3.

Experimento R1		Experimento R2		Experimento R3	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	98,50
0,30	50,40	0,40	60,00	0,10	83,90
0,50	37,70	1,00	56,20	0,20	70,50
1,50	29,40	1,30	64,90	1,00	74,90
2,00	36,80	2,00	61,40	1,50	73,60
2,50	37,40	2,40	59,20	2,50	66,00
4,00	31,40	2,70	57,60	3,00	63,00
5,00	27,40	3,50	53,20	4,00	57,20
6,00	23,30	4,00	50,40	4,50	54,20
6,50	21,30	4,50	47,50	6,00	45,40
7,00	19,30	5,50	41,90	6,50	42,50
8,00	15,30	6,00	39,10	7,50	36,60
9,00	11,30	7,00	33,40	8,50	30,80
9,50	9,30	7,50	30,60	9,00	27,80
10,00	7,30	8,50	24,90	9,50	24,90
11,00	3,30	9,00	22,10	10,50	19,10
12,00	0,00	9,50	19,20	11,50	13,20
14,00	0,00	10,50	13,60	12,00	10,30
17,00	0,00	11,00	10,70	13,50	1,50
22,00	0,00	12,00	5,10	14,00	0,00
24,00	0,00	12,50	2,30	14,80	3,52
30,00	0,00	15,00	0,00	15,00	10,80
		18,00	0,00	15,20	15,71
		19,00	0,00	15,30	21,40
		20,00	0,00	15,30	32,20
		23,60	1,30	15,30	37,00
		23,60	10,40	15,30	42,40
		23,70	15,20	15,50	59,10
		23,80	35,20	15,80	57,80
		24,00	43,90	16,30	58,60
		24,50	50,90	17,50	60,40
		26,00	58,00	18,00	60,40
		27,20	60,60	20,00	61,30
		28,20	62,10	26,00	62,60
		29,70	62,90	28,00	63,00

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.5 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con la velocidad de agitación para los experimentos R4 a R6.

Experimento R4		Experimento R5		Experimento R6	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	99,10	0,00	100,00	0,00	98,20
0,10	96,20	0,30	89,10	0,20	90,10
0,20	87,60	0,50	87,90	0,30	86,00
0,20	77,80	0,80	86,80	1,20	88,90
0,50	74,20	1,30	84,50	1,30	85,60
0,90	78,10	1,80	82,20	1,50	85,50
1,30	80,80	2,50	78,00	2,00	86,90
1,50	79,60	3,30	73,80	3,00	81,30
2,50	74,30	4,00	69,60	3,50	78,60
4,00	66,10	4,50	66,90	5,00	70,20
4,50	63,40	5,30	62,70	6,00	64,70
5,50	57,90	6,00	58,50	6,50	61,90
6,50	52,50	6,30	57,10	9,00	48,00
8,50	41,60	6,50	55,70	9,50	45,20
9,50	36,10	7,30	51,50	11,50	34,10
10,50	30,70	8,30	45,90	13,00	25,70
11,00	27,90	8,50	44,50	14,00	20,20
12,50	19,80	9,00	41,80	14,30	23,00
13,00	17,10	9,50	39,00	14,30	28,40
14,50	8,90	10,00	36,20	14,40	35,20
14,90	10,30	10,30	34,80	14,50	41,50
14,90	15,50	11,00	30,60	14,50	47,40
14,90	21,60	11,50	27,80	14,50	52,60
14,90	33,10	12,00	25,00	14,60	58,20
15,00	39,00	13,00	19,40	14,60	63,30
16,30	54,70	13,50	16,70	16,60	63,80
17,80	55,50	14,70	21,60	21,70	65,80
18,40	56,10	15,20	60,20	25,20	68,10
19,30	57,70	17,70	62,10	25,50	68,70
20,30	57,00	19,20	63,70	27,00	70,50
21,30	57,60	20,20	64,50	28,00	71,40
22,30	58,40	22,20	65,80	29,50	71,80
24,00	57,60	26,00	67,10		
26,00	59,20				
29,00	62,20				

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.6 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con la velocidad de agitación para los experimentos R7 a R9.

Experimento R7		Experimento R8		Experimento R9	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	100,10	0,00	99,60
0,10	91,60	0,10	97,80	0,10	94,00
0,50	86,60	0,10	93,30	0,30	92,60
1,00	91,40	0,20	88,90	0,50	92,00
1,50	88,90	1,00	91,40	0,80	90,00
2,50	89,90	1,50	90,90	1,00	88,40
4,00	85,80	2,00	94,00	1,30	91,70
5,00	83,10	2,40	92,90	2,00	96,00
5,50	81,70	3,00	91,50	4,00	92,40
6,50	79,00	4,00	89,00	4,50	91,50
9,00	72,30	5,00	86,50	5,50	89,70
9,50	70,90	5,50	85,30	7,50	86,10
10,00	69,60	6,50	82,80	8,00	85,20
10,50	68,20	9,00	76,60	9,50	82,50
11,50	65,50	10,50	72,70	10,00	81,60
12,00	64,10	11,00	71,40	11,50	78,90
13,00	61,40	11,50	70,20	13,00	76,20
14,00	58,70	12,00	68,90	14,30	73,50
15,00	80,70	15,60	85,40	17,00	90,80
16,50	84,00	17,90	87,30	18,00	90,90
17,00	84,70	19,50	89,10	20,50	91,70
18,50	85,80	21,00	90,60	21,00	92,80
19,50	86,40	22,50	91,00	22,50	93,10
21,00	87,60	23,30	91,60	23,00	93,30
21,50	87,80	24,00	91,10	24,50	93,50
22,50	88,10	24,50	91,20	25,00	93,50
23,00	88,20	25,00	91,40	27,00	93,50
25,00	88,40	25,50	91,30	29,00	94,00
28,00	89,00	27,00	91,50		
		29,00	91,70		

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.7 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con el caudal de aire para los experimentos R11 a R13.

Experimento R11		Experimento R12		Experimento R13	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	101,44	0,00	98,50	0,00	100,00
0,10	87,26	0,12	83,90	0,18	88,93
0,13	73,32	0,30	70,50	0,32	74,73
0,19	77,87	0,50	74,88	1,15	79,37
1,00	76,58	0,78	73,63	1,25	78,05
1,50	68,61	1,04	71,97	1,50	69,93
2,00	65,56	1,25	69,04	2,00	66,82
2,43	59,46	2,00	64,17	3,00	60,60
2,98	56,41	4,00	55,24	3,50	57,50
3,98	52,26	5,50	45,51	5,00	52,17
4,98	49,21	6,50	41,66	6,00	47,06
6,47	39,82	7,50	36,65	6,50	42,85
7,96	28,97	8,00	30,79	9,00	32,63
9,50	23,19	9,50	27,85	9,50	29,53
11,00	15,08	10,00	23,19	11,50	17,42
11,50	12,72	11,00	17,07	13,00	10,20
12,00	11,17	12,00	11,62	14,00	7,99
12,50	7,53	12,50	8,89	14,50	4,88
13,00	5,87	13,50	3,64	15,50	1,55
14,00	2,64	15,00	1,77	16,00	0,00
15,00	1,02	16,00	9,32	16,34	3,71
15,50	0,00	16,44	14,41	16,35	10,04
16,00	0,00	16,45	20,13	16,35	15,06
16,21	5,87	16,45	24,33	16,37	21,68
16,33	11,54	16,47	31,18	16,38	29,73
16,48	18,28	16,48	40,52	16,40	33,13
16,67	28,18	16,50	51,04	16,49	39,22
16,68	33,49	16,89	57,66	16,73	44,94
16,69	38,48	18,00	59,02	16,92	49,82
16,70	44,10	19,00	59,10	17,21	55,33
16,71	48,88	21,00	57,80	18,44	59,04
16,73	54,29	22,00	60,40	20,50	61,27
16,77	57,93	23,00	60,40	21,07	62,12
16,90	61,46	25,50	61,30	22,50	62,96
16,96	60,11	26,00	61,50	23,43	64,02
17,05	60,94	27,50	62,00	25,00	59,77
21,00	61,78				
23,93	62,82				

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.8 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con el caudal de aire para los experimentos R14 a R16.

Experimento R14		Experimento R15		Experimento R16	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	97,52	0,00	99,85	0,00	99,80
0,10	83,06	0,25	89,73	0,11	88,50
0,16	69,80	0,50	81,30	0,15	80,59
1,05	74,13	0,75	71,69	0,20	71,58
1,50	72,89	1,25	68,20	0,45	68,26
2,50	65,31	4,50	59,23	0,85	71,85
3,00	62,41	4,75	56,56	1,25	74,34
4,00	56,60	5,25	54,22	1,50	73,28
4,50	53,70	6,00	48,88	2,50	68,33
6,00	44,99	7,25	41,50	4,00	60,81
6,50	42,09	8,25	35,71	4,50	58,31
7,50	36,28	8,50	33,37	5,50	53,30
8,50	30,48	9,00	30,70	6,50	48,28
9,00	27,58	9,50	26,69	8,50	35,76
9,50	24,67	10,00	23,99	9,50	31,08
10,50	20,87	12,00	15,44	10,50	25,16
11,50	15,06	13,50	7,89	11,00	22,93
12,00	12,16	15,25	4,24	12,50	13,85
14,00	4,41	16,00	4,00	13,00	10,82
15,80	5,47	16,28	7,83	14,00	7,90
16,00	10,69	16,29	11,78	15,00	5,30
16,25	15,54	16,30	16,42	15,50	2,50
16,25	21,19	16,31	20,67	15,67	6,07
16,26	26,83	16,33	25,16	15,83	11,02
16,28	31,88	16,37	29,64	16,02	16,01
16,29	36,63	16,55	34,50	16,03	21,83
16,30	41,98	16,77	40,28	16,04	27,64
16,32	46,53	17,80	52,32	16,05	32,84
16,35	51,68	18,30	52,51	16,07	41,74
16,38	55,14	19,30	52,99	16,12	49,25
16,45	58,51	19,80	53,28	16,18	57,66
16,80	57,22	21,30	53,86	16,32	58,44
17,00	58,81	22,30	55,39	19,50	58,96
17,48	59,80	25,00	57,23	20,50	59,03
18,01	59,80	23,50	60,28	21,00	59,24
20,00	60,69			22,50	59,81
22,00	60,89			23,50	60,28
24,00	61,38				

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.9 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis IGTS8* con el caudal de aire para los experimentos R17 y R18.

Experimento R17		Experimento R18	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	99,90
0,25	94,28	0,11	92,35
0,50	85,85	0,15	84,10
0,75	76,24	0,20	74,69
1,25	72,72	0,45	71,23
4,50	64,78	0,85	74,98
4,75	62,11	1,25	77,57
5,25	56,77	1,50	76,47
6,00	51,43	2,50	71,30
7,25	44,05	4,00	63,46
8,50	36,14	4,50	60,84
9,00	32,69	5,50	57,61
10,50	26,79	6,50	52,38
11,50	21,11	8,50	39,43
12,50	14,39	9,50	34,52
14,00	9,84	10,50	29,01
16,00	7,30	11,00	26,61
15,55	11,29	12,50	17,44
15,66	15,14	13,00	13,54
15,79	20,79	14,50	8,92
15,80	26,43	15,50	6,60
15,82	31,48	15,54	10,42
15,83	36,23	15,58	18,41
15,86	41,58	15,59	27,34
15,93	46,13	15,60	38,87
16,04	51,28	15,62	44,06
16,30	54,74	15,64	49,54
17,19	58,11	15,68	53,84
17,97	56,82	15,81	54,42
19,15	57,70	16,00	55,97
21,75	57,60	19,50	55,29
23,74	58,40	20,00	55,87
25,00	59,20	20,50	56,65
		23,00	55,24
		25,00	57,42

Crecimiento de Rhodococcus erythropolis IGTS8

Tabla 3.10 - Evolución de la concentración del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 con el caudal de aire para los experimentos R19 y R20.

Experimento R19		Experimento R20	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	99,10	0,00	100,00
0,40	96,20	0,10	90,43
1,00	87,60	0,50	82,34
1,30	77,80	1,00	73,13
2,00	74,20	1,50	69,75
4,50	66,10	2,50	73,41
5,50	63,38	4,00	68,96
6,00	57,93	5,50	61,82
7,00	52,48	6,50	56,14
9,00	43,36	9,00	43,88
9,50	37,38	10,00	38,63
10,00	31,40	10,50	34,89
10,50	28,41	11,50	30,10
11,50	25,42	12,00	24,69
12,00	21,94	13,00	22,35
13,00	15,96	14,00	13,34
14,00	12,97	14,88	8,18
15,25	7,84	14,89	10,85
15,29	12,40	14,90	15,12
15,33	17,28	14,92	19,04
15,34	21,76	14,94	23,17
15,35	26,48	14,98	27,30
15,37	31,20	15,11	31,78
15,39	36,32	15,30	37,10
15,43	42,40	15,80	51,78
15,56	53,41	16,30	51,97
15,75	53,61	16,80	52,44
16,25	54,10	17,80	52,73
18,00	54,39	18,36	53,30
19,49	54,98	19,30	54,82
21,50	56,55	20,30	54,15
22,50	55,86	21,30	54,72
24,00	56,45	22,30	55,48
25,00	57,23	25,30	56,24

3.1.2. Discusión de los resultados

Los datos de las Tablas 3.2 y 3.3 se han representado en las Figuras 3.1 y 3.2 respectivamente, para una más clara y concisa observación del crecimiento. Como puede observarse, tanto en la Tabla 3.2 como en la Figura 3.1, la evolución que sigue la biomasa a lo largo del crecimiento, para las diferentes velocidades de agitación, presenta una fase de latencia relativamente corta, de aproximadamente 2 h, si se tiene en cuenta que el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria del crecimiento es de unas 22 h. Una vez transcurren las primeras horas de la fase de adaptación, el cultivo inicia un crecimiento exponencial, que dura entre 18 y 20 h, en el que tiene lugar la mayor velocidad en el consumo de nutrientes y que permite a los microorganismos incrementar su velocidad de crecimiento. Finalizada la fase exponencial de crecimiento, se inicia la fase estacionaria, que dura aproximadamente 2 h, y en la que se alcanza la concentración celular máxima.

Si se analiza la variación de la biomasa a medida que cambia la velocidad de agitación a la que se ha realizado el cultivo, se observa que un incremento en la agitación desde 100 hasta 250 rpm favorece el crecimiento celular, como consecuencia de una mejora en la mezcla y una mayor velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo, que se encuentra en condiciones limitantes de oxígeno. Sin embargo, en los experimentos donde la agitación va de 250 hasta 450 rpm, a pesar de que la transferencia de oxígeno se incrementa con el aumento de la velocidad de agitación, los valores de la concentración de biomasa en función del tiempo no presentan un cambio significativo. Por último, si se continúa aumentando la velocidad de agitación, por encima de 450 rpm, el crecimiento parece verse afectado y la velocidad de crecimiento es menor.

Parecidas conclusiones se extraen al analizar los resultados de la concentración máxima de biomasa a un tiempo de crecimiento de 24 h. Así, puede observarse que, cuando se incrementa la velocidad de agitación desde 100 hasta 250 rpm, la concentración máxima de biomasa pasa de un valor de 1,23 g/L, para 100 rpm, hasta 1,69 g/L, para 250 rpm. Sin embargo, cuando se aumenta la velocidad de agitación desde 250 hasta 450 rpm, la concentración de biomasa máxima se mantiene prácticamente constante, en un valor aproximado de 1,70 g/L. Por encima de 450 rpm, este valor disminuye desde 1,57 g/L, para 500 rpm, hasta 0,79 g/L, para 700 rpm.

En cuanto a los resultados que se recogen en la Tabla 3.3 y se han representado en la Figura 3.2, se puede observar que el caudal de aire no influye sobre el crecimiento; es decir, los valores de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de crecimiento son prácticamente los mismos para todo el intervalo de caudales de aire, y muy similares a los alcanzados en el experimento “central” R3, a 250 rpm y un caudal de aire de 2 L/min.

Por otro lado, cuando se estudian las relaciones entre los parámetros hidrodinámicos que rigen un proceso microbiano, es bastante frecuente encontrar en la literatura que los perfiles de oxígeno están relacionados con el crecimiento y/o la formación del producto (Kaya-Çeliker y col., 2009; Mehmood y col., 2010; Li y col., 2011). Por ello, entre otras razones, es importante registrar y analizar la evolución del oxígeno a lo largo de un proceso de fermentación.

Los datos de la evolución del oxígeno disuelto durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8, de nuevo para una más fácil visualización, se han representado en las Figuras 3.3 y 3.4, respectivamente para los experimentos en los que se ha variado la velocidad de agitación (R1 a R9) y el caudal de aire (R11 a R20). Como se puede observar en ambas figuras, la concentración de oxígeno disuelto en todos los experimentos disminuye hasta alcanzar un valor mínimo, que se corresponde con la mitad de la fase exponencial del crecimiento, momento en el que se requiere la mayor cantidad de energía y se produce una mayor demanda de oxígeno por parte de las células. Posteriormente, la concentración de oxígeno aumenta a medida que los requerimientos energéticos y, por tanto, la demanda de oxígeno disminuyen. Esta evolución se ajusta al comportamiento de la mayoría de los cultivos de microorganismos en operación *batch*, como, por ejemplo, es el caso de *Xanthomonas campestris* (Garcia-Ochoa y col., 2000) y *Escherichia coli* (Çalik y col., 2006), entre otros.

Del análisis de la evolución que sigue el oxígeno disuelto en el caldo durante cada uno de los diferentes experimentos llevados a cabo con *R. erythropolis* IGTS8, se pueden distinguir dos comportamientos, dependiendo de la velocidad de agitación (Figura 3.3). En un primer grupo de experimentos, que comprende el intervalo de agitaciones entre 100 y 450 rpm, se observa una acusada caída de la concentración del oxígeno disuelto, llegando hasta muy bajos valores de saturación, entre 0 y 20 %. De

este grupo de experimentos, cabe resaltar que bajo condiciones de agitación muy bajas (entre 100 y 150 rpm) el oxígeno disuelto cae hasta un valor de prácticamente 0 % a las pocas horas de cultivo, entre 12 y 15 h, manteniéndose en esa situación hasta el final del crecimiento. En cuanto al segundo grupo de experimentos, que comprende el intervalo de agitaciones entre 500 y 700 rpm, se destaca un cambio en el perfil de oxígeno comparado con la evolución a agitaciones bajas, presentando ahora un descenso suave de la concentración de oxígeno, se llega a alcanzar valores mínimos de un 60 % del valor de saturación. Este cambio de comportamiento se corresponde con lo observado en el crecimiento, donde para velocidades de agitación superiores a 450 rpm, la velocidad de crecimiento y la máxima concentración de biomasa obtenida disminuyen conforme aumenta la velocidad de agitación.

En cuanto a la evolución del oxígeno disuelto durante los experimentos llevados a cabo bajo diferentes caudales de aire, en la Figura 3.4 se puede apreciar un leve descenso en la velocidad a la que *R. erythropolis* IGTS8 consume el oxígeno disuelto conforme se aumenta el caudal desde 1 hasta 10 L/min.

En los siguientes apartados se describe la velocidad de crecimiento y el consumo de oxígeno mediante modelos cinéticos, que van a permitir llegar a similares conclusiones analizando los parámetros cinéticos de dichos modelos.

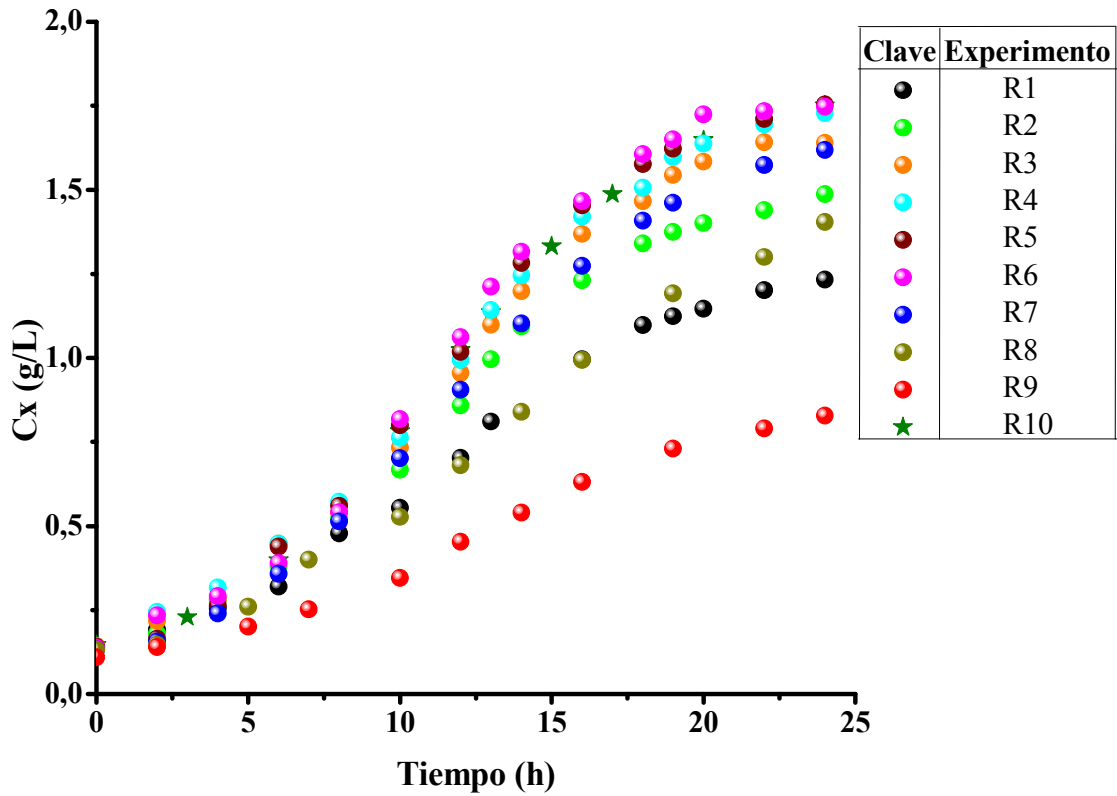


Figura 3.1 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintas velocidades de agitación del cultivo.

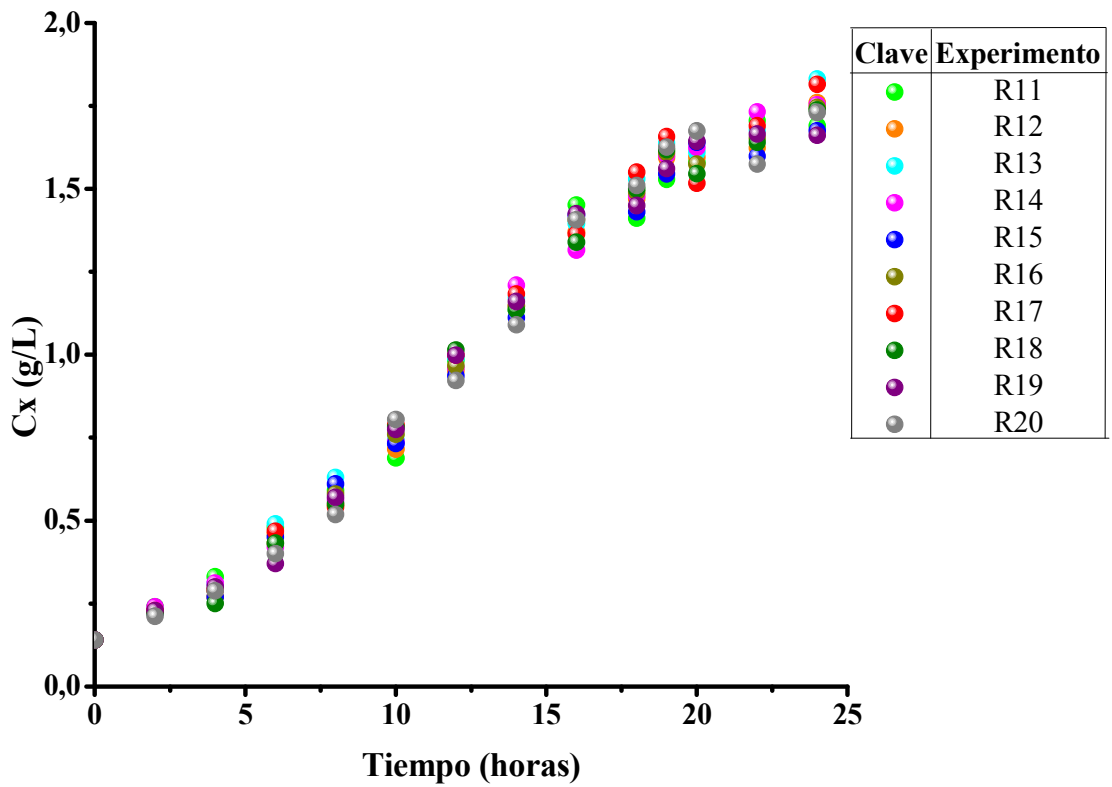


Figura 3.2 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintos caudales de aire del cultivo.

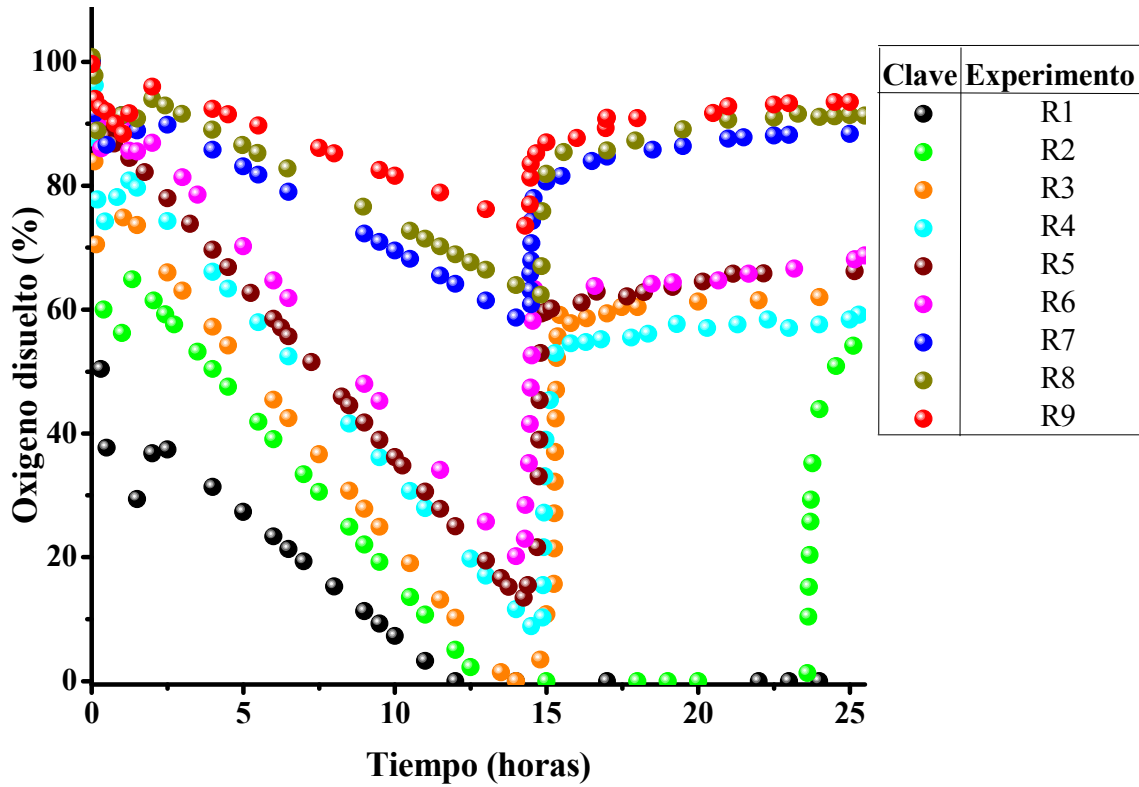


Figura 3.3 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintas velocidades de agitación del cultivo.

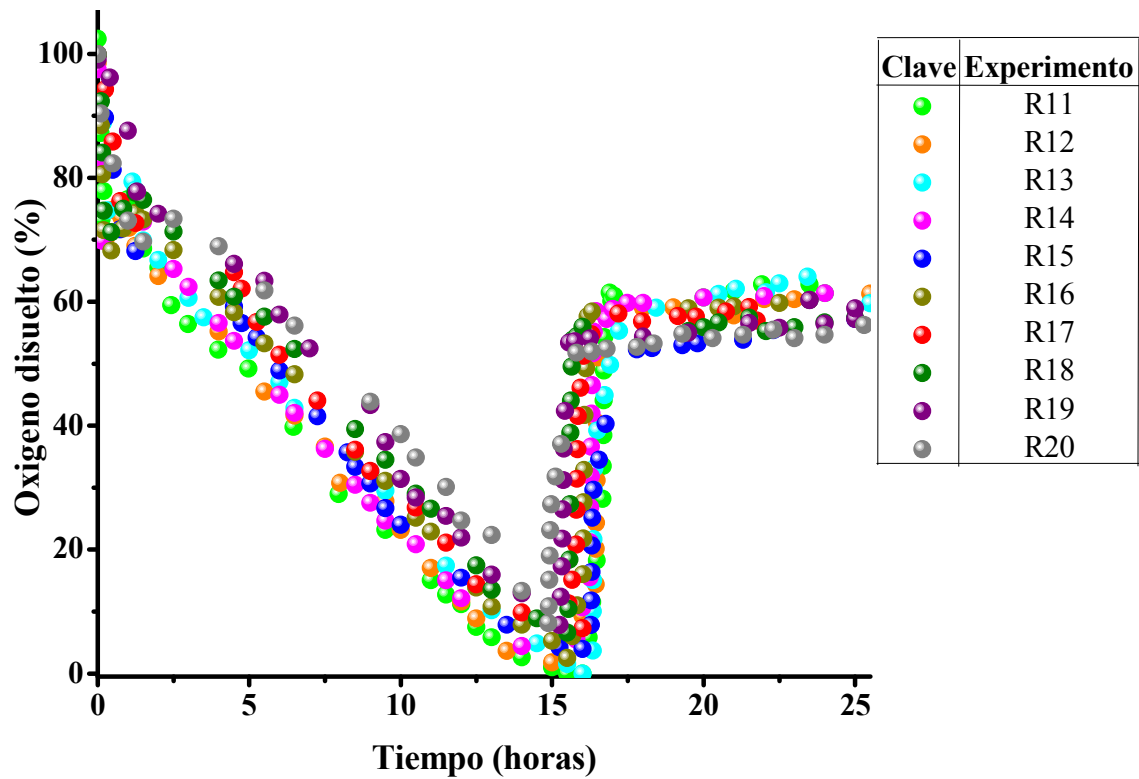


Figura 3.4 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintos caudales de aireación.

3.1.3. Modelo Cinético del Crecimiento

Con el fin de conocer la influencia que ejercen sobre el crecimiento las diferentes condiciones de operación utilizadas en el cultivo del microorganismo, se hace necesario realizar un estudio cinético. Como es bien conocido, a pesar de que el crecimiento de las células es un fenómeno muy complejo, a menudo se puede obtener una descripción aproximada, pero razonablemente buena, del mismo utilizando ecuaciones relativamente simples. Por tanto, se trata de recurrir a un modelo sencillo, que sea capaz de proporcionar valores de parámetros cinéticos representativos del sistema, cuya comparación permita establecer las condiciones óptimas de crecimiento y/o determinar condiciones hidrodinámicas en las que el crecimiento del microorganismo se vea o no afectado por dichas condiciones.

En este trabajo se va a emplear un modelo de tipo no estructurado y no segregado (García-Ochoa y Santos, 1994a), es decir, aquel en el que las células se consideran todas iguales en promedio y desde el punto de vista cinético se tratan como si fueran un componente más del medio de cultivo, sin definir ninguna estructura interna. Aunque esta simplificación es muy importante, la aplicación de este tipo de modelos proporciona ecuaciones relativamente sencillas con sentido físico, que describen razonablemente la evolución de la biomasa con el tiempo. Así, basta con analizar la concentración de biomasa para describir la evolución del crecimiento del microorganismo, sin necesidad de realizar otras medidas más específicas, como pueden ser cierto tipo de parámetros biológicos internos de las células (García-Ochoa y Santos, 1994b).

Una de las aproximaciones más utilizada es la que conduce a la denominada *ecuación logística*. Esta ecuación se puede obtener a partir de la propuesta por Pearl y Reed (1920) y que considera la existencia de un sustrato limitante del crecimiento, S , como se muestra en la Ec. [3.1].

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_m \cdot C_s \cdot C_x \quad [3.1]$$

donde μ_m es la velocidad específica de crecimiento, C_s es la concentración de sustrato limitante del crecimiento y C_x es la concentración biomasa.

La velocidad de desaparición de sustrato se puede escribir como:

$$\frac{dC_s}{dt} = -Y_{xs} \cdot \frac{dC_x}{dt} \quad [3.2]$$

siendo Y_{xs} el rendimiento de sustrato en biomasa, un coeficiente estequiométrico que relaciona la biomasa formada por sustrato consumido.

Integrando la Ec. [3.2] con la siguiente condición límite:

$$t = 0 \therefore C_s = C_s^0 ; C_x = C_x^0 \quad [3.3]$$

se obtiene, despejando la concentración de biomasa, C_x

$$C_x = C_x^0 + Y_{xs} (C_s^0 - C_s) \quad [3.4]$$

Por otro lado, teniendo en cuenta que la concentración máxima de biomasa alcanzada (C_x^{max}) cuando se consume todo el sustrato (C_s) puede expresarse como:

$$C_x^{max} = C_x^0 + Y_{xs} \cdot C_s^0 \quad [3.5]$$

sustituyendo esta última ecuación en la Ec. [3.4], se llega a:

$$C_s^0 = \frac{C_x^{max} - C_x^0}{Y_{xs}} \quad [3.6]$$

Despejando C_s de la Ec [3.4], se obtiene

$$C_s = \frac{C_x^{max} - C_x}{Y_{xs}} \quad [3.7]$$

expresión que puede escribirse como:

$$C_s = \frac{C_x^{max}}{Y_{xs}} \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{max}}\right) \quad [3.8]$$

Sustituyendo en la Ec. [3.1], se tiene:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_m \cdot C_x \cdot \frac{C_x^{max}}{Y_{xs}} \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{max}}\right) \quad [3.9]$$

Expresión de la velocidad de crecimiento de las células que se puede simplificar a la siguiente:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{max}}\right) \quad [3.10]$$

siendo μ la velocidad específica un parámetro que engloba a otros parámetros del modelo, de acuerdo a:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot C_x^{max}}{Y_{xs}} \quad [3.11]$$

Integrando la Ec. [3.10] con la siguiente condición límite:

$$t = 0 \quad \therefore \quad C_x = C_x^0 \quad [3.12]$$

se obtiene la ecuación logística antes citada:

$$C_x = \frac{C_x^0 \cdot \exp(\mu \cdot t)}{1 - \left[\left(\frac{C_x^0}{C_x^{max}} \right) \cdot (1 - \exp(\mu \cdot t)) \right]} \quad [3.13]$$

Los parámetros cinéticos de este modelo de crecimiento son, por tanto, μ y C_x^{max} , ya que habitualmente se supone el valor de C_x^0 conocido. La velocidad específica de crecimiento, μ , está relacionada estrechamente con el tiempo de duplicación de las células durante la fase exponencial de crecimiento. La concentración máxima de biomasa, C_x^{max} , representa la concentración que se alcanza en la fase estacionaria del crecimiento. El ajuste del modelo a los datos experimentales de concentración de biomasa (C_x) y tiempo (t), para la determinación de los parámetros cinéticos (μ y C_x^{max}), se ha realizado en su forma integral mediante una regresión no lineal en simple respuesta. Es decir, se han ajustado separadamente los datos de C_x vs t de los distintos experimentos, fijando el valor de C_x^0 en el valor determinado experimentalmente. En la Tabla 3.11 se muestran los valores de los parámetros (μ y C_x^{max}) obtenidos al ajustar la ecuación logística a los valores experimentales de concentración de biomasa con el tiempo en los experimentos R1 a R20. En la misma tabla también se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones realizadas (error del parámetro estimado, la suma de los residuos al cuadrado, el valor de la F de Fischer y el intervalo de confianza). En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestran los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la predicción proporcionada al aplicar el

modelo cinético con el valor óptimo de los parámetros, respectivamente para los experimentos R1 a R10 y R11 a R20. En ambas figuras se puede observar que la evolución de la biomasa muestra una tendencia típica del crecimiento microbiano, que permite distinguir una fase de latencia inicial, seguida de una fase exponencial donde la velocidad de crecimiento es máxima, alcanzándose, por último, una fase estacionaria en la que se llega a la concentración de biomasa máxima. Asimismo, se pone de manifiesto que la variación de la concentración de biomasa a lo largo del tiempo de cultivo que predice el modelo cinético, en todos los experimentos realizados, es muy cercana a la de los datos experimentales. Este hecho es confirmado por los valores de los parámetros estadísticos, que proporcionan una medida cuantitativa sobre la bondad del ajuste realizado y la fiabilidad de cada uno de los parámetros de la ecuación ajustada. Como puede verse en la Tabla 3.11, los valores obtenidos de la F de Fischer, en todos los casos, son mucho mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95 %; además, se puede apreciar que la suma de los residuos al cuadrado, SRC, es muy baja, lo cual indica que la reproducción de los datos experimentales es buena. Por lo tanto, se puede concluir que la ecuación logística, utilizada en este estudio como modelo cinético de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8, es capaz de describir, de forma adecuada la evolución de este sistema en las condiciones estudiadas. Además, los intervalos de los parámetros (Δ) para el 95 % de confianza son muy estrechos (de alrededor de un 4 %).

Tabla 3.11 - Valores de los parámetros calculados por ajuste del modelo cinético de crecimiento para los experimentos R1 a R20.

Exp.	C_x^0 (g/L)	μ (h ⁻¹)	Δ	C_x^{max} (g/L)	Δ	SRC	F de Fisher	
							Obtenido	Tabulado (95 %)
R1	0,14	0,230	± 0,007	1,289	± 0,040	0,002	3317	3,72
R2	0,14	0,253	± 0,006	1,538	± 0,038	0,002	2322	3,44
R3	0,14	0,257	± 0,007	1,721	± 0,059	0,004	1794	3,12
R4	0,13	0,264	± 0,008	1,757	± 0,065	0,005	3931	3,05
R5	0,14	0,262	± 0,005	1,812	± 0,047	0,002	2836	3,91
R6	0,14	0,264	± 0,007	1,854	± 0,059	0,004	9088	3,83
R7	0,13	0,242	± 0,006	1,697	± 0,050	0,003	2169	3,13
R8	0,13	0,207	± 0,005	1,514	± 0,054	0,002	1242	3,54
R9	0,13	0,146	± 0,005	1,018	± 0,076	0,003	2977	3,19
R10	0,15	0,259	± 0,006	1,802	± 0,053	0,002	2106	3,29
R11-R20	0,13	0,256	± 0,006	1,731	± 0,055	0,002	1369	3,42

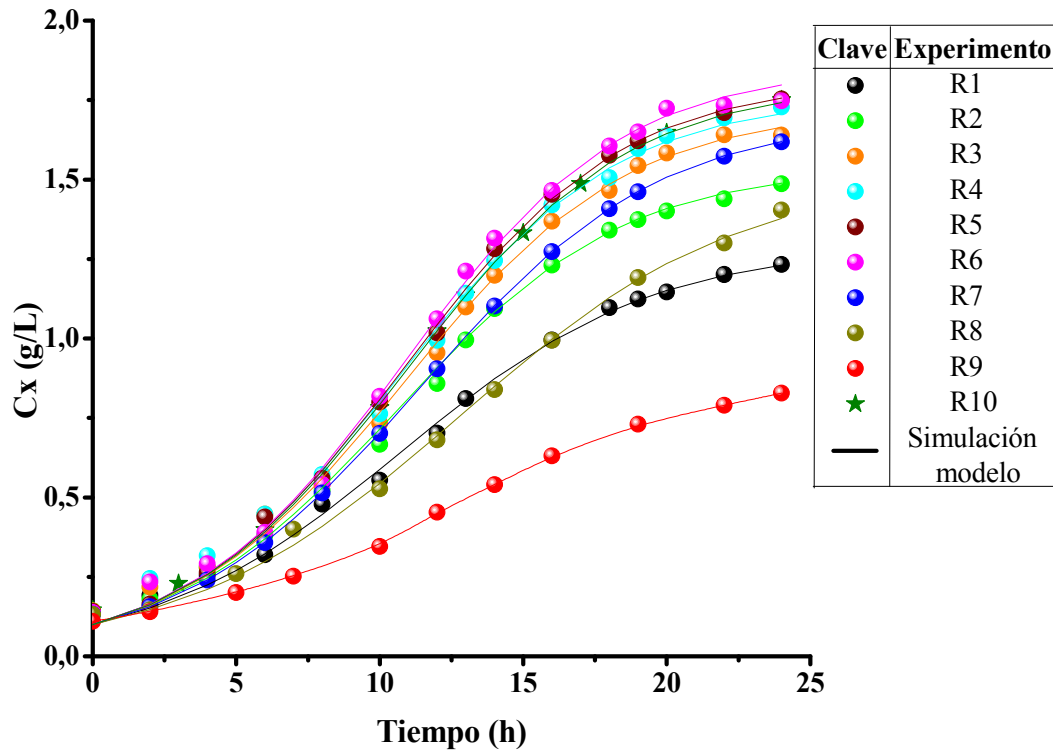


Figura 3.5 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintas velocidades de agitación (●) y de la simulación del crecimiento obtenida por el modelo (—).

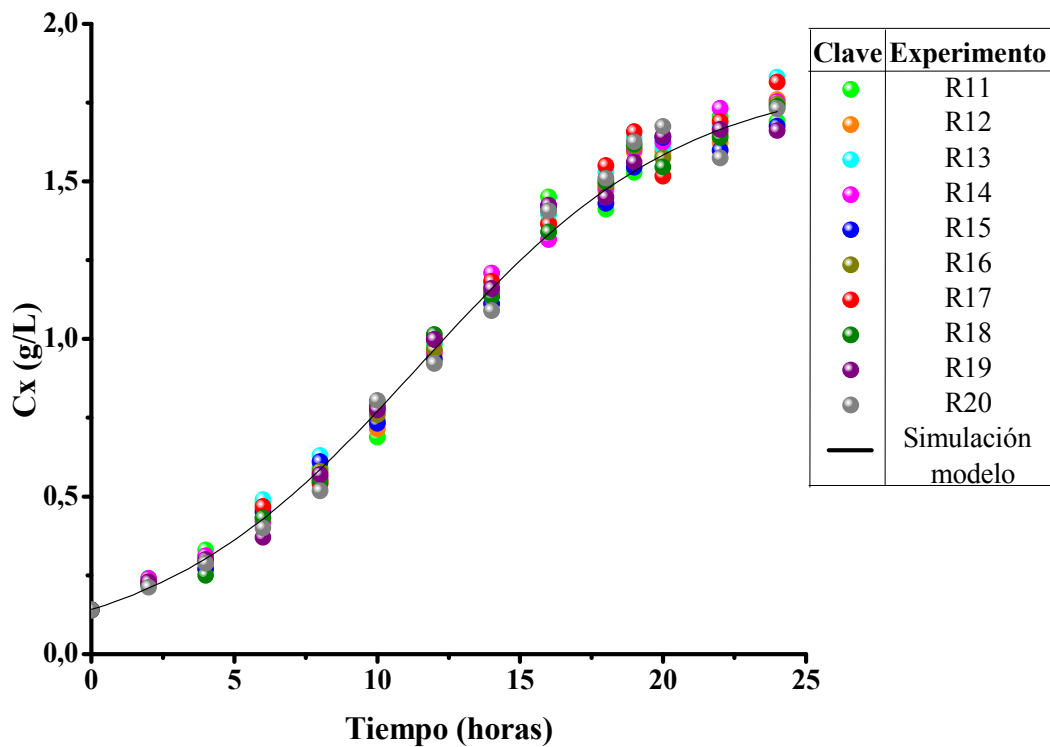


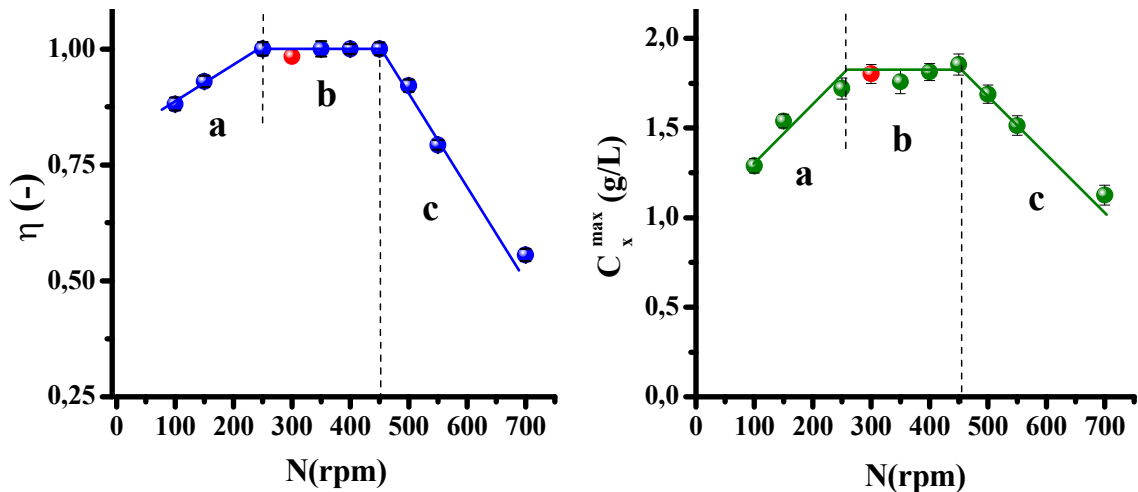
Figura 3.6 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 bajo distintos caudales de aire (●) y de la simulación del crecimiento obtenida por el modelo (—).

Una forma de expresar los resultados anteriormente descritos es definir un “factor de efectividad” para el crecimiento, η . Este parámetro representa la relación entre la velocidad específica de crecimiento experimental, μ , y la velocidad específica máxima de crecimiento, μ^* , sin limitación por otros fenómenos, como puede ser una inadecuada mezcla de nutrientes, el aporte de oxígeno o algún tipo de estrés o daño celular. Este parámetro se ha definido por medio de la siguiente ecuación (García-Ochoa y col., 2013a):

$$\eta = \frac{\mu}{\mu^*} \quad [3.14]$$

En la Figura 3.7 se muestra la influencia de la velocidad de agitación sobre el citado factor de efectividad, η , y sobre la concentración máxima de biomasa, C_x^{max} . Como puede observarse, la influencia de N en η y C_x^{max} puede ser dividida en tres regiones, dependiendo de la velocidad de agitación. Ante unas condiciones en las que el transporte de oxígeno puede estar limitando el crecimiento debido a bajas velocidades de agitación (zona a), se observa que al aumentar la agitación desde 100 hasta 250 rpm, y por consiguiente la velocidad de transporte de oxígeno (OTR), los valores del η y la C_x^{max} también aumentan. Conforme la velocidad de agitación se incrementa por encima de 250 rpm y hasta 450 rpm, se alcanza una “plataforma” (zona b), en la que el valor del η y la C_x^{max} apenas varía, independientemente de la velocidad de agitación; en esta zona, OTR debe ser ya superior a la velocidad de consumo (OUR) por parte de las células y, en consecuencia, la velocidad de crecimiento no varía. Sin embargo, el comportamiento observado en la zona b, resulta estar limitado hasta 450 rpm, ya que una vez que se excede esta velocidad de agitación (zona c), se observa un descenso en ambos parámetros, η y la C_x^{max} . En la última zona, se puede interpretar que el microorganismo se encuentra en unas condiciones hidrodinámicas que afectan de forma significativa a su crecimiento, y teniendo en cuenta que ya el aporte de oxígeno no controla la velocidad de dicho crecimiento, se puede concluir que otro fenómeno la está haciendo disminuir, sea un estrés hidrodinámico u oxidativo.

Por otro lado, se puede observar que el caudal de aire, Q , no influye sobre η y C_x^{max} , ya que los valores de ambos parámetros no dependen del valor del caudal de aire alimentado, tomando valores de 1 y de 1,73, respectivamente, en todos los experimentos.



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento
 Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento
 Zona c: Condiciones de estrés por OTR para el crecimiento

Figura 3.7 - Influencia de la velocidad de agitación en el factor de efectividad para el crecimiento, η , y la concentración de biomasa máxima, C_x^{max} , en cultivos de *R. erythropolis* IGTS8. (●, ●) Experimentos R1 a R9 y (●) Experimento R10.

3.2. MEDIDA del TRANSPORTE y del CONSUMO de OXÍGENO

Como ha sido mencionado anteriormente, entre los diversos factores nutricionales que influyen en los bioprocesos aerobios, el oxígeno es un sustrato clave utilizado por las células para su crecimiento y mantenimiento, así como para otras rutas metabólicas, incluyendo la síntesis de todo tipo de metabolitos, entre ellos los productos buscados y/o las enzimas necesarias para su obtención. La evolución de la concentración de oxígeno disuelto en un biorreactor depende de la velocidad a la que el oxígeno es transportado desde la fase gas (OTR) a la fase líquida (medio de crecimiento o producción) y de la velocidad con la que las células toman el oxígeno de la fase líquida (OUR).

Los valores de OUR y OTR cambian no sólo por la presencia de la biomasa, sino también con las condiciones de transporte de oxígeno (determinadas por las condiciones hidrodinámicas en el biorreactor) y, frecuentemente, la velocidad de consumo de oxígeno está controlada por la velocidad con la que el oxígeno es transferido al caldo de fermentación, es decir, por la OTR (Çalik y col., 2004; Kocabas

y col., 2006; Garcia-Ochoa y col., 2010; Doran, 2013). Como se ha podido comprobar anteriormente, ambos fenómenos tienen una importancia decisiva en los cultivos de *R. erythropolis*, debido a que el transporte de oxígeno puede llegar a ser la etapa controlante del proceso de crecimiento.

Por tanto, teniendo en cuenta que durante el proceso podrían darse diferentes situaciones dependiendo de las velocidades de transporte y de consumo, se hace necesario un análisis detallado de estos fenómenos.

3.2.1. Resultados experimentales

A continuación se exponen los resultados experimentales obtenidos en la medida del transporte y del consumo de oxígeno en cultivos de *R. erythropolis* IGTS8 bajo la influencia de diferentes condiciones de hidrodinámicas. Las variables de operación que se han estudiado han sido la velocidad de agitación y el caudal de aire, pues, como ya se ha mencionado anteriormente, son las variables de operación que influyen de forma más directa en la hidrodinámica del sistema.

En este caso se ha medido el coeficiente volumétrico de transferencia de materia a través de un método físico empleando la técnica dinámica, para velocidades de agitación de 100 a 700 rpm y caudales de aireación de 1 a 3 L/min. Los datos experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 3.12, en la que también se indican las condiciones de velocidades de agitación y caudal de aireación utilizados.

Asimismo, a distintas concentraciones celulares, se han obtenido los valores de OUR utilizando el método dinámico clásico. En las Tablas 3.13 y 3.14 se muestran los datos de la evolución de OUR con la concentración celular, para las distintas velocidades de agitación (con un caudal de aire constante de 2 L/min) y para diferentes caudales de aireación (manteniendo constante la velocidad de agitación en 250 rpm), respectivamente.

Tabla 3.12. - *Datos experimentales de k_La en función de la velocidad de agitación y para diferentes caudales*

N (rpm)	k_La (s^{-1})		
	Q 1 L/min	Q 2 L/min	Q 3 L/min
100	0,0004	0,0006	0,0009
150	0,0010	0,0027	0,0020
200	0,0018	0,0039	0,0035
250	0,0028	0,0048	0,0055
300	0,0041	0,0061	0,0079
350	0,0056	0,0079	0,0107
400	0,0073	0,0122	0,0140
450	0,0092	0,0155	0,0177
500	0,0113	0,0199	0,0219
550	0,0137	0,0250	0,0271
700	0,0282	0,0434	0,0462

Tabla 3.13 - *Datos experimentales de OUR en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo.*

Cx (g/L)	OUR · 10 ⁷ (mol/L · s)						
	R2	R3	R4	R6	R7	R8	R9
0,20	1,35	1,47	1,56	1,62	1,07	0,53	nd
0,31	2,11	2,24	2,32	2,37	1,72	0,89	0,65
0,66	3,62	3,75	3,88	3,91	2,94	1,58	1,22
1,09	4,28	4,42	4,52	4,54	3,10	1,82	1,42
1,64	2,30	2,39	2,49	2,50	1,44	0,95	0,51
1,76	1,52	1,82	1,89	1,73	0,88	0,58	0,17

Tabla 3.14 - *Datos experimentales de OUR en función de la concentración celular bajo distintos caudales de aireación del medio de cultivo.*

Cx (g/L)	OUR · 10 ⁷ (mol/L · s)									
	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20
0,16	1,47	1,49	1,50	1,52	1,55	1,64	1,49	1,56	1,56	1,56
0,94	3,73	3,77	3,82	3,86	4,19	4,34	3,61	4,20	4,38	4,28
1,64	2,18	2,12	2,16	2,12	2,13	2,21	2,19	2,13	2,12	2,05

3.2.2. Discusión de los Resultados

Los datos experimentales presentados en la Tabla 3.12 se muestran en la Figura 3.8, donde se representan los valores obtenidos de $k_L a$ para distintas velocidades de agitación y diferentes caudales de aireación. En dicha figura se puede observar que el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$, aumenta al incrementarse dichas variables, es decir, un aumento en la velocidad de agitación o en el caudal de aireación produce un aumento en la velocidad del transporte de materia. Al aumentar la velocidad de agitación o el caudal de aireación del medio, se consigue un aumento de la velocidad de transporte de oxígeno y, por tanto, una mayor concentración de oxígeno disuelto en el medio. Asimismo, en este trabajo se ha realizado una predicción teórica de $k_L a$ determinando el coeficiente de transporte, k_L y del área interfacial específica, a , para lo que se ha empleado el modelo predictivo, basado en leyes y ecuaciones fundamentales, desarrollado en trabajos previos (Garcia-Ochoa y Gomez 2004), y aplicado con éxito a diferentes sistemas (Garcia-Ochoa y Gomez, 2005; Garcia-Ochoa y Gomez, 2009; Santos y col., 2006; Zou y col., 2012). De esta manera, para la estimación de $k_L a$ se ha seguido el procedimiento detallado en el Apartado 2.4.1 del Capítulo de Materiales y Métodos de la presente Memoria y las propiedades físicas del sistema, los parámetros geométricos y las condiciones de operación resumidas en la Tabla 2.8 del citado apartado.

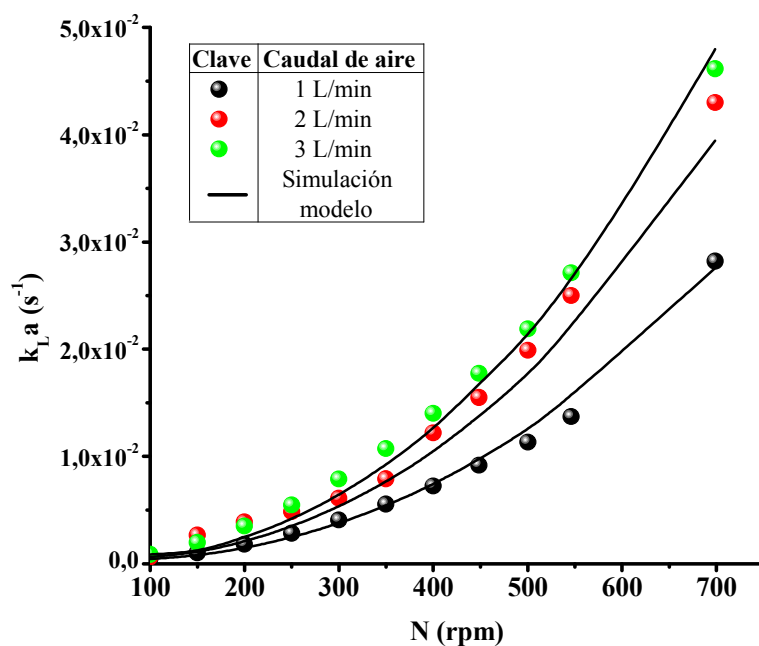


Figura 3.8. Variación del coeficiente volumétrico de transporte, $k_L a$, experimental (●) y predicho por el modelo propuesto (—), con la velocidad de agitación, N .

Por otro lado, en cuanto a la velocidad de consumo de oxígeno, a la vista de los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que OUR cambia a lo largo del crecimiento del microorganismo. Así, se observa un aumento importante durante la fase exponencial, ya que es en este momento cuando los microorganismos están invirtiendo una mayor cantidad de energía en desarrollar sus actividades metabólicas y en su crecimiento, llegando a su valor máximo en la mitad de dicha fase, en torno a las 14 h de crecimiento y a una concentración celular de, aproximadamente, 1 g/L. Una vez se alcanza su máximo valor, OUR_{max} , disminuye la velocidad de crecimiento de la biomasa y, con ello, OUR tiende a disminuir; las células entran en la fase estacionaria, donde dejan de centralizar toda su energía en reproducirse y sólo consumen oxígeno para su mantenimiento.

Para una mejor descripción de los resultados, en las Figuras 3.9 y 3.10 se han representado los valores experimentales de la OUR recogidos en las Tablas 3.12 y 3.13. Como se puede observar, el máximo valor alcanzado de la OUR varía en función de la velocidad de agitación, desde el valor más bajo de $0,94 \cdot 10^{-7}$ mol/L·s, obtenido a 700 rpm, hasta el valor más alto, de aproximadamente $4,3 \cdot 10^{-7}$ mol/L·s, alcanzado para el intervalo de agitaciones de 250 a 450 rpm (ver Figura 3.9); sin embargo, la OUR apenas cambia con el caudal de aire, pues se encuentra entre $3,61 \cdot 10^{-7}$ mol/L·s para un caudal de 1 L/min y de $4,37 \cdot 10^{-7}$ mol/L·s para un caudal de 10 L/min (ver Figura 3.10).

En la Figura 3.9 puede observarse que al aumentar la velocidad de agitación desde 150 hasta 250 rpm, OUR muestra un leve aumento a lo largo del crecimiento. Sin embargo, desde 250 hasta 450 rpm, OUR es prácticamente la misma según avanza el crecimiento para cada una de las agitaciones. Para este caso, en el intervalo de agitación desde 250 hasta 450 rpm, la OTR puede llegar a ser igual o mayor que la OUR, sin manifestarse una situación de estrés. Por otro lado, se puede ver que existe una velocidad de agitación (en torno a 450 rpm), por encima de la cual los valores de consumo de oxígeno disminuyen. Es decir, para valores de la agitación superiores a 450 rpm, las variaciones de OUR con la concentración celular son menores, e independientemente de ésta sus valores son inferiores. Este hecho puede deberse a que a elevadas velocidades de agitación, aunque se favorece el transporte, aumentando la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, el microorganismo se puede ver afectado a consecuencia de las fuerzas de cizalla del sistema, sufriendo una situación de estrés hidrodinámico. Este efecto de las fuerzas hidrodinámicas sobre la OUR ha sido

puesto de manifiesto en otros trabajos con diferentes sistemas (Sahoo y col., 2003; Çalik y col., 2004; Alonso y col., 2012; Garcia-Ochoa y col., 2013a).

En cuanto a la influencia del incremento del caudal de aire, se puede apreciar que esta variable no tiene gran influencia en la velocidad de consumo de oxígeno. Cuanto mayor es el caudal, mayor es la disponibilidad de oxígeno en el medio líquido a la vez que se puede producir daño celular como consecuencia de la “explosión” o ruptura de las burbujas en la superficie del líquido; sin embargo, esto no se observa, ya que las diferencias en la variación de la OUR en función de la concentración celular conforme aumenta el caudal de aire (Figura 3.10) no son significativas (20 % de diferencia entre los valores máximo y mínimo), además de no seguir una tendencia clara en función del aumento del caudal de aire. Ante dichos resultados, se puede afirmar que, en las condiciones estudiadas en este trabajo (desde 1 a 10 L/min y una agitación constante de 250 rpm), los cultivos de *R. erythropolis* no se ven afectados por los fenómenos de coalescencia y la ruptura de burbujas en la superficie del caldo.

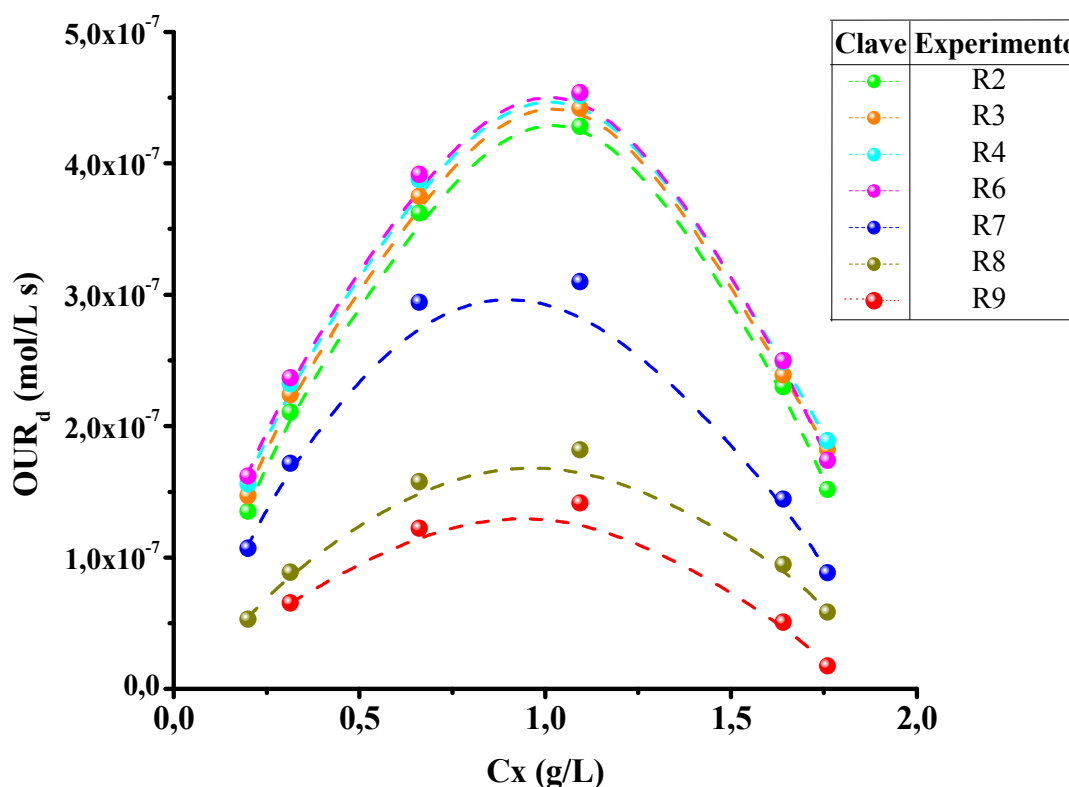


Figura 3.9 - Evolución de OUR con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación del medio de cultivo.

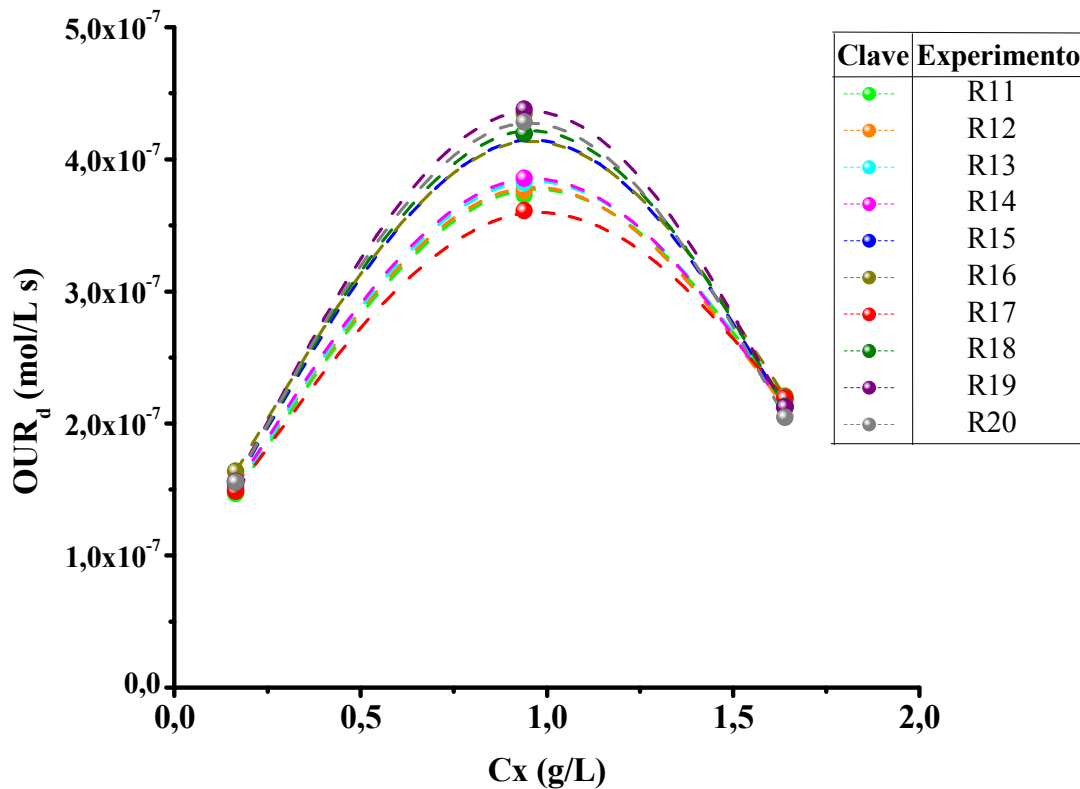


Figura 3.10 - Evolución de OUR_d con la concentración celular, a distintos caudales de aireación del medio de cultivo.

3.2.3. Modelo Cinético del Consumo de Oxígeno (OUR)

Con el fin de identificar las condiciones de operación que determinan límites hidrodinámicos para el cultivo de las células, y su influencia en las respuestas fisiológicas del microorganismo, es necesario formular un modelo matemático que describa las velocidades de transporte (OTR) y consumo (OUR) de oxígeno.

Pirt (1982), en un estudio sobre el crecimiento de *Aerobacter cloacae*, encontró que la velocidad de consumo de sustrato para el crecimiento y el mantenimiento puede estar relacionada con dos parámetros característicos, m_i e Y_{ij} . El primero describe la velocidad de utilización del sustrato para el mantenimiento, y el segundo un rendimiento en biomasa del sustrato. El modelo de Pirt ha sido considerado válido para la mayoría de sustratos que están involucrados en el metabolismo de la energía celular, siendo este modelo soportado por resultados experimentales y consideraciones energéticas (Pirt, 1965 y 1982). Muchos autores han modelizado el consumo de oxígeno en función de estos dos parámetros, m_i e Y_{ij} (Pinches y Pallent, 1986; Calik y col.,

2004; Garcia-Ochoa y col., 2000; Santos y col., 2006; Garcia-Ochoa y col., 2010; Garcia-Ochoa y col., 2013a), ya que el microorganismo consume oxígeno en las reacciones metabólicas que lleva a cabo con dos objetivos principalmente: el mantenimiento celular en estado viable y el crecimiento celular, aunque, en ocasiones, hay que tener en cuenta otras actividades, como la producción de uno o varios productos o metabolitos (Santos y col., 2006). Así pues, el consumo de oxígeno, en la forma más simple, puede ser expresado de acuerdo a la relación:

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_x = m_{O_2} \cdot C_x + Y_{OX} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad [3.15]$$

donde C_x es la concentración de biomasa, m_{O_2} el coeficiente de consumo de oxígeno para el mantenimiento e Y_{OX} , el rendimiento macroscópico de oxígeno consumido para el crecimiento celular.

Pinches y Pallent (1986), por su parte, observaron que la velocidad de consumo de oxígeno se podía relacionar con la concentración celular, de forma que cuando la concentración de oxígeno es el factor limitante del crecimiento del microorganismo, se puede utilizar una cinética de tipo Monod, tanto para la velocidad de crecimiento específica como para el consumo específico de oxígeno. De esta manera, en los bioprocesos aerobios donde el oxígeno es sólo consumido para el mantenimiento y el crecimiento celular, la Ec. [3.15] lleva a la siguiente expresión:

$$OUR = m_{O_2} \cdot C_x + Y_{OX} \cdot \mu \cdot C_x \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{max}}\right) \quad [3.16]$$

Esta ecuación describe la evolución de la velocidad global de consumo de oxígeno, OUR, con respecto a la concentración de la biomasa a lo largo del crecimiento del microorganismo.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el consumo específico de oxígeno, q_{O_2} , se define como el consumo global de oxígeno, OUR, por unidad de biomasa, se llega a:

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{C_x} = m_{O_2} + Y_{OX} \cdot \mu \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^{max}}\right) \quad [3.17]$$

si se agrupan términos y se definen unos nuevos parámetros, α y β , se puede escribir:

$$q_{O_2} = \alpha - \beta \cdot C_x \quad [3.18]$$

es decir que, de acuerdo a este modelo, el consumo específico del microorganismo, q_{O_2} , depende de la concentración de biomasa, C_x , de forma lineal, donde la ordenada en el origen es:

$$\alpha = m_{O_2} + Y_{OX} \cdot \mu \quad [3.19]$$

y la pendiente de la recta viene dada por:

$$\beta = -\frac{Y_{OX} \cdot \mu}{C_x^{max}} \quad [3.20]$$

Como se ha comentado, la ecuación [3.17] predice una variación lineal del consumo específico de oxígeno con respecto a la concentración de biomasa presente, que, a su vez, como se ha visto, puede depender de las condiciones de operación o hidrodinámicas en el biorreactor. Asimismo, del análisis de dicha ecuación se deduce que el consumo específico tiende a un valor mínimo a tiempos largos, que se corresponde con el valor del término de mantenimiento en esas condiciones, cuando ya no hay crecimiento, y que se alcanza cuando C_x toma su valor máximo; es decir, cuando el microorganismo alcanza la fase estacionaria Y_{OX} se hace cero y el consumo específico tiende al valor de m_{O_2} .

Teniendo en cuenta estos aspectos, una adecuada representación de q_{O_2} vs C_x debe proporcionar relaciones lineales, rectas, al menos en un cierto intervalo, como la que se muestra en la Figura 3.11, cuya pendiente y ordenada en el origen variarán en función de las condiciones hidrodinámicas del medio de cultivo.

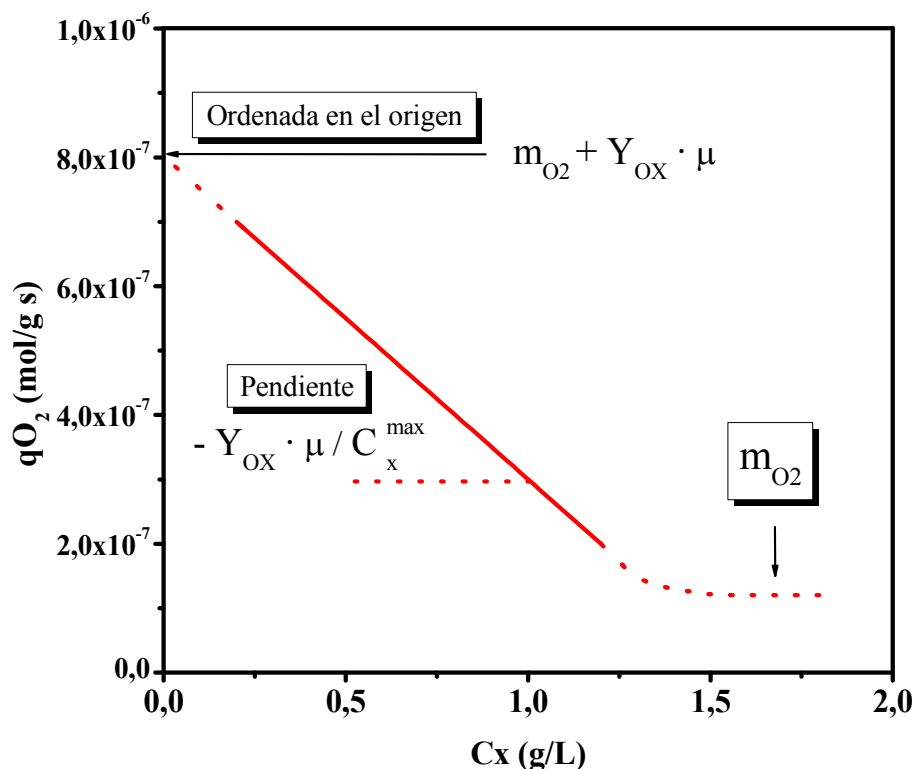


Figura 3.11 - Simulación de la dependencia del consumo específico de oxígeno, q_{O_2} , respecto a la concentración de biomasa, C_x , utilizando valores arbitrarios de acuerdo a la Ec. [3.18].

A partir de los datos experimentales de OUR y de la concentración de biomasa, se han calculado los valores del consumo específico, q_{O_2} , según la Ec. [3.17]. En la Tabla 3.15 se muestran los datos de la evolución de q_{O_2} con la concentración celular, para las distintas velocidades de agitación utilizadas y para un caudal de aire constante de 2 L/min. Asimismo, en la Tabla 3.16 se presentan los datos de la evolución que sigue q_{O_2} con la concentración celular para distintos caudales de aire y a una velocidad de agitación constante de 250 rpm.

Del análisis de los resultados se puede afirmar que el consumo específico de oxígeno, q_{O_2} , presenta una evolución respecto a la concentración celular prácticamente lineal y decreciente, tal y como predice la Ec. [3.17], tomando el valor máximo al inicio de la fase exponencial, para después disminuir linealmente hasta alcanzar la fase estacionaria, donde tiende a un valor mínimo.

Como se puede observar en los valores que se muestran en la Tabla 3.15, al igual que sucede con el comportamiento de OUR, al aumentar la velocidad de agitación desde 150 hasta 450 rpm, los valores de q_{O_2} aumentan ligeramente, con una evolución con el crecimiento muy similar. Por el contrario, para valores superiores a 450 rpm, el consumo específico disminuye sensiblemente con la velocidad de agitación. Por otro lado, a partir de los valores que se muestran en la Tabla 3.16, se puede apreciar que el caudal de aire no afecta a q_{O_2} , observándose una evolución muy similar para todo el intervalo de caudales de aire estudiados, de 1 a 10 L/min.

A la vista de estos resultados, se ha llevado a cabo la modelización de q_{O_2} de acuerdo a la Ec. [3.17], mediante un ajuste lineal de los datos de q_{O_2} frente a C_x , para cada una de las velocidades de agitación estudiadas, obteniéndose el valor de la ordenada en el origen, α , y de la pendiente de la recta, β . En la Tabla 3.17 se muestran los valores de α y β junto con los parámetros estadísticos y los valores tabulados de F de Fischer para un nivel de confianza del 95 %. Como se puede observar, los parámetros estimados tienen significado estadístico dentro del nivel de confianza establecido. A partir de los valores de β y α , se han calculado los parámetros del consumo característicos del modelo, es decir, el coeficiente de mantenimiento, m_{O_2} , y el rendimiento macroscópico, Y_{OX} . En la Tabla 3.18 se muestran los valores de los parámetros m_{O_2} e Y_{OX} . A su vez, en la Figura 3.12 se muestran los valores de q_{O_2} experimentales y los predichos a partir del modelo a lo largo del tiempo de crecimiento. Como se puede observar, el modelo reproduce razonablemente los datos experimentales.

Por otro lado, en la Figura 3.13 se muestran los valores de q_{O_2} experimentales y los predichos a partir del modelo a lo largo del tiempo de crecimiento para distintos caudales de aire y a una velocidad de agitación constante de 250 rpm, obteniendo valores de los parámetros similares al experimento R3. Como se puede observar, también ahora el modelo reproduce razonablemente los datos experimentales. Del análisis de las figuras, se pone de manifiesto que el consumo específico de oxígeno no solo depende de la concentración celular del cultivo, sino también del estado metabólico de la población microbiana; de manera que las células experimentan un mayor consumo durante sus primeras horas de crecimiento, pues todo el oxígeno que consumen está dedicado casi exclusivamente a su multiplicación. Sin embargo, conforme avanza el

tiempo de fermentación, además de multiplicarse, las células comienzan a realizar otras funciones metabólicas, que hacen que el rendimiento de oxígeno consumido para la producción de biomasa (Y_{OX}) disminuya, por lo que el consumo específico comienza a disminuir también. Finalmente, cuando el microorganismo alcanza la fase estacionaria, el rendimiento macroscópico se hace cero. A partir de este momento, disminuye la actividad metabólica, igualándose la tasa de crecimiento a la tasa de muerte; y dedicándose fundamentalmente a la producción de los metabolitos secundarios, para lo que requiere, en general, una menor cantidad de energía, lo que se corresponde con el mínimo de consumo de oxígeno. A este consumo de oxígeno, representado mediante el término de mantenimiento celular, m_{O_2} , que no redundará en aumento de biomasa se le asocia con el mantenimiento de funciones vitales tales como la renovación del material celular, mantenimiento de gradientes de concentración y movilidad, etc.

En cuanto al comportamiento de los parámetros m_{O_2} e Y_{OX} frente al cambio de la velocidad de agitación, como puede observarse en la Figura 3.14, ambos parámetros están estrechamente relacionados con las condiciones fluidodinámicas y de transporte del oxígeno al medio. Así, para el intervalo de velocidades de agitación de 150 a 450 rpm, se obtienen valores similares tanto para m_{O_2} como para Y_{OX} para las diferentes agitaciones. El comportamiento observado para ambos parámetros en el mencionado intervalo de agitación se corresponde con lo comprobado en apartados anteriores, en los que se observó que la evolución de m_{O_2} a lo largo del crecimiento era muy similar. Sin embargo, para valores de la velocidad de agitación superiores a 450 rpm, los parámetros m_{O_2} e Y_{OX} disminuyen al aumentar la agitación. Esta disminución puede interpretarse teniendo en cuenta las respuestas fisiológicas que los microorganismos tienen ante unas condiciones hidrodinámicas no favorables para su crecimiento, que se traducen en cambios en el consumo específico de oxígeno y, como se vio en el Apartado 3.1.3, en una menor velocidad de crecimiento, sea por estrés hidrodinámico u oxidativo.

Tabla 3.15 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo.

Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^7$ (mol/g · s)						
	R2	R3	R4	R6	R7	R8	R9
0,20	6,75	7,55	7,60	7,92	5,70	2,90	nd
0,31	6,71	7,33	7,40	7,54	5,65	3,03	2,08
0,66	5,47	5,76	5,86	5,92	4,45	2,38	1,85
1,09	3,91	4,04	4,13	4,15	2,83	1,66	1,29
1,64	1,40	1,46	1,52	1,52	0,88	0,58	0,31
1,76	0,86	1,03	1,07	0,99	0,50	0,33	0,10

Tabla 3.16 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintos caudales de aireación del medio de cultivo.

Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^7$ (mol/g · s)									
	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20
0,16	8,96	9,11	9,12	9,27	9,47	9,99	9,06	9,49	9,53	9,50
0,94	3,97	4,01	4,07	4,11	4,47	4,63	3,85	4,47	4,66	4,56
1,64	1,33	1,29	1,32	1,29	1,30	1,35	1,34	1,30	1,30	1,25

Tabla 3.17 – Valores de los parámetros α y β a diferentes velocidades de agitación.

Exp	$\alpha \cdot 10^7$	Error $\cdot 10^8$	$\beta \cdot 10^7$	Error $\cdot 10^8$	SRC $\cdot 10^3$	F de Fisher	
						Obtenido	Tabulado 95 %
R2	8,84	2,1	-4,58	2,0	3,0	6776	2,71
R3	8,40	2,5	-4,26	2,3	3,0	3802	2,98
R4	8,41	2,1	-4,26	1,9	1,0	4936	2,94
R6	8,02	1,7	-4,05	1,4	5,0	8244	3,07
R7	6,28	1,6	-3,24	1,4	3,0	8172	2,66
R8	3,33	1,7	-1,73	1,8	2,0	8146	3,12
R9	2,00	1,3	-1,05	1,4	4,0	8075	3,02

Tabla 3.18 - Valores de los parámetros cinéticos del consumo a diferentes velocidades de agitación.

Experimento	$Y_{ox} \cdot 10^6$ (mol/g)	$m_{O_2} \cdot 10^8$ (mol/g · s)
R2	6,60	7,92
R3	6,70	8,39
R4	6,20	8,68
R6	5,90	8,47
R7	4,70	5,45
R8	2,50	2,68
R9	1,50	1,39

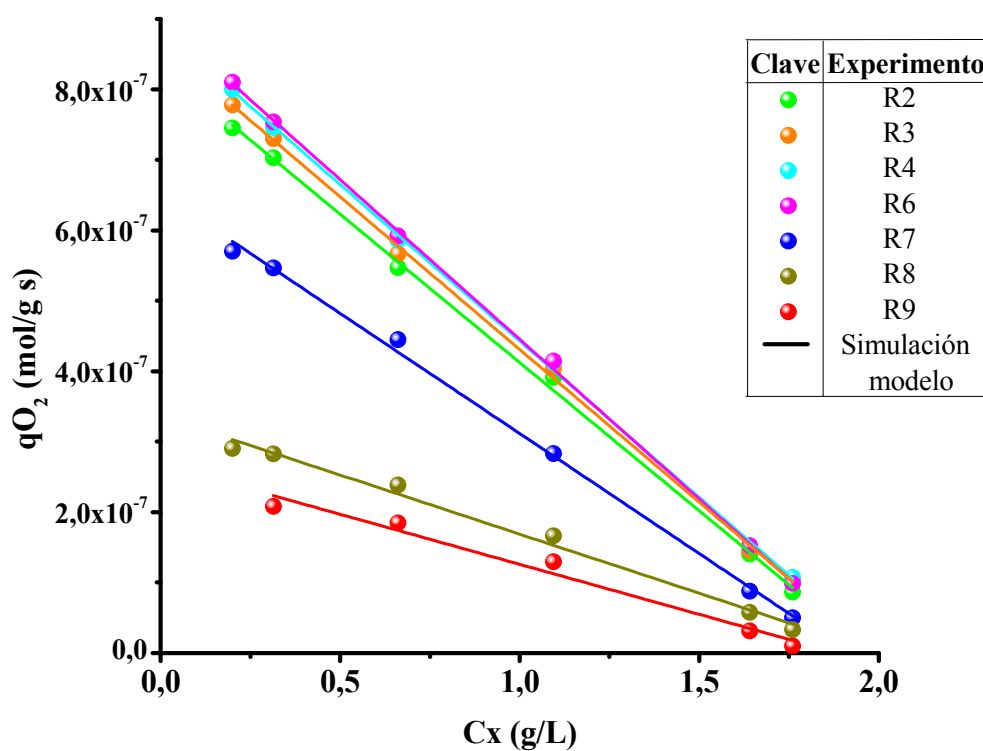


Figura 3.12 – Evolución de los valores experimentales (●) y de la simulación realizada por el modelo (—) de q_{O_2} con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación del medio de cultivo.

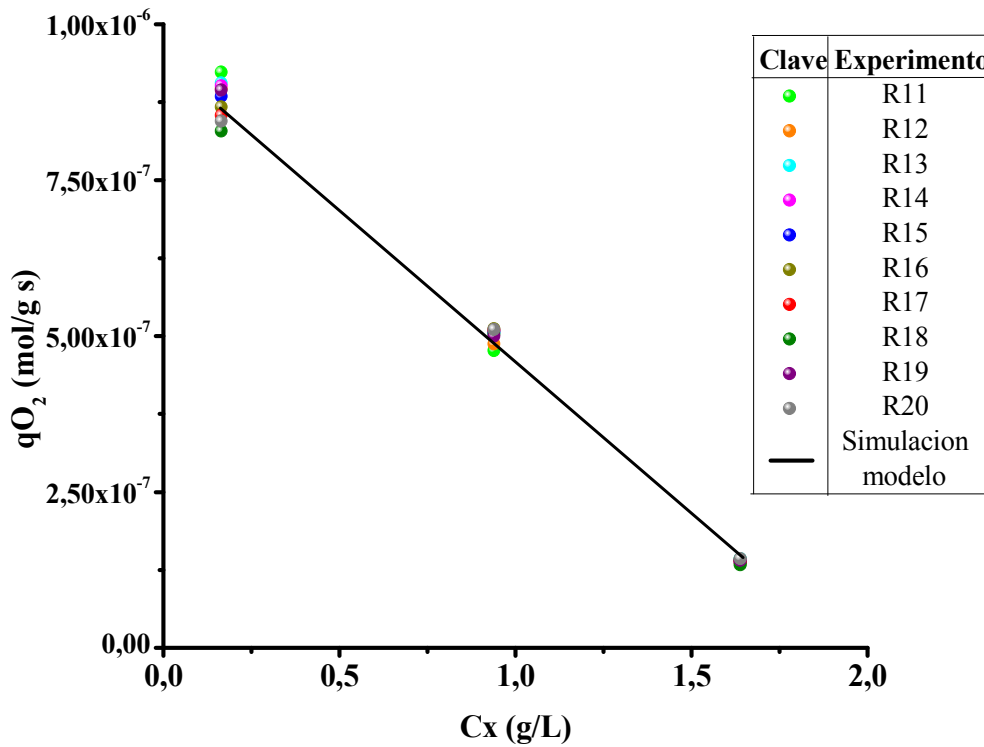


Figura 3.13 - Evolución de los valores experimentales (●) y de la simulación realizada por el modelo (—) de q_{O_2} con la concentración celular, a distintos caudales de aireación del medio de cultivo.

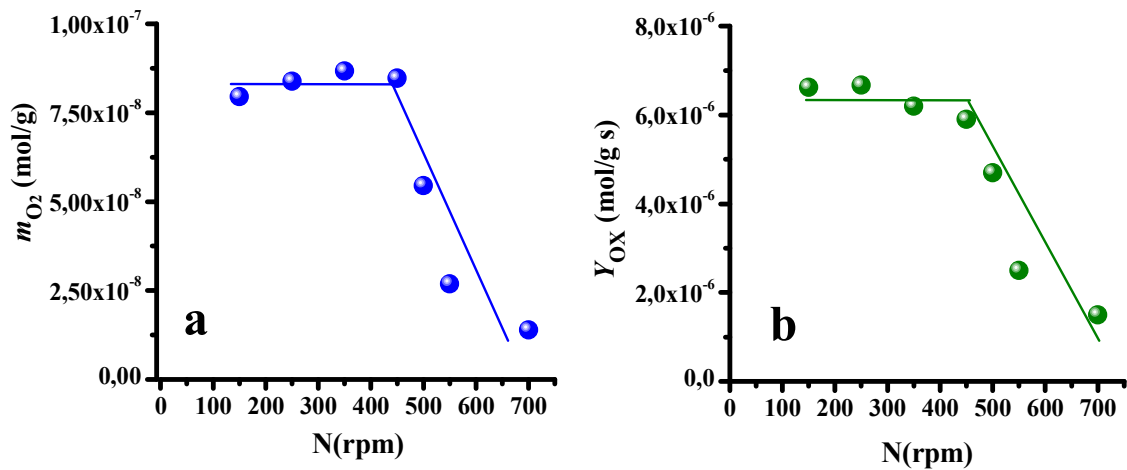


Figura 3.14 - Variación de los parámetros m_{O_2} (a) e Y_{Ox} (b), a diferentes velocidades de agitación para el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8.

Para determinar las condiciones en las que se está produciendo una limitación de la velocidad de transporte de oxígeno al cultivo, se puede realizar un análisis teórico considerando el número modificado de *Damköhler* (*Da*) (Çalik y col., 2004; Garcia-Ochoa y col., 2010; Garcia-Ochoa y col., 2013a), definido como:

$$Da = \frac{OUR_{max}}{OTR_{max}} \quad [3.21]$$

La máxima velocidad posible de consumo de oxígeno, la OUR_{max} , viene dada por la siguiente expresión:

$$OUR_{max} = \left(m_{O_2} + \frac{\mu}{Y_{XO}} \right) \cdot C_x \quad [3.22]$$

por lo tanto, la OUR_{max} depende de los parámetros cinéticos m_{O_2} , Y_{XO} y μ y de la concentración de biomasa, C_x .

Asimismo, la máxima velocidad de transferencia de oxígeno, OTR_{max} , desde el gas al líquido, es alcanzada cuando la concentración de oxígeno disuelto es cero, y viene dada por:

$$OTR_{max} = k_L a \cdot C^* \quad [3.23]$$

donde C^* es la concentración de saturación de oxígeno en la fase líquida, cuyo valor determinado experimentalmente es $0,245 \text{ mol/m}^3$.

OTR_{max} es un valor fijo que sólo depende de las condiciones de operación en el biorreactor (velocidad de agitación y de aireación) y, en menor medida, de las propiedades del medio.

De esta manera, cuando $Da > 1$, la velocidad de consumo de oxígeno es mayor que la velocidad de transporte (siendo la transferencia la etapa controlante del proceso global). Por el contrario, si $Da \leq 1$, la velocidad de transporte será mayor que la velocidad de consumo (OTR deja de ser la etapa controlante y las posibles limitaciones por efectos de la hidrodinámica del sistema sobre las reacciones bioquímicas, pasarían a controlar la reacción global del proceso).

Los resultados obtenidos del cálculo del Da para las distintas concentraciones celulares y para las diferentes velocidades de agitación en las que se cultivó a R .

erythropolis IGTS8 se muestran en las Tablas 3.19 y 3.20. A su vez, para una mejor visualización de los resultados, estos datos se han representado en la Figura 3.15. Como puede observarse en la citada figura, para todas las condiciones hidrodinámicas, el Da aumenta conforme se incrementa la concentración celular. También se pone de manifiesto que el Da decrece conforme aumenta la velocidad de agitación, esto es, cuando la resistencia a la transferencia de materia disminuye. Así, para agitaciones bajas, cuando la biomasa y, por tanto, OUR aumentan, la resistencia a la transferencia de oxígeno es claramente la condición limitante del crecimiento y del consumo. En estas condiciones Da toma valores mayores de 1 para concentraciones de biomasa superiores a 0,75 g/L para una agitación de 150 rpm y de 1,5 g/L, para 250 rpm, aproximadamente. Cuando las condiciones de operación son iguales o superiores a 350 rpm, no hay limitación por transporte, y Da toma valores menores que 1 a lo largo de todo el crecimiento. A la vista de estos resultados, se puede concluir que, a partir de 350 rpm, no hay limitación a la velocidad global del bioproceso por una insuficiente OTR. Por otro lado, se pone de manifiesto que, por encima de 450 rpm, el descenso en el crecimiento observado en apartados anteriores (Figura 3.7) y del consumo de oxígeno (Figura 3.9), viene determinado por el hecho de que las células son afectadas por las fuerzas hidrodinámicas del sistema y no por un insuficiente valor de OTR.

Para el caso en el que se realizó el cultivo de *R. erythropolis* IGTS8 utilizando diferentes caudales de aire, desde 1 hasta 10 L/min, los valores del Da a lo largo del crecimiento son semejantes a los del experimento R3 y, por tanto, con limitaciones de oxígeno en la última etapa de crecimiento.

Crecimiento de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

Tabla 3.19 - Variación a lo largo del crecimiento de los parámetros de OTR_{max} , OUR_{max} y Da , para los experimentos R2 a R4 y R6.

Experimento	C_x (g/L)	$OTR_{max} \cdot 10^6$ (mol/L · s)	$OUR_{max} \cdot 10^7$ (mol/L · s)	Da (-)
R2	0,20	0,649	2,279	0,351
	0,31		2,804	0,432
	0,66		5,729	0,883
	1,09		9,235	1,422
	1,64		13,94	2,147
	1,76		14,84	2,286
R3	0,20	1,186	2,199	0,185
	0,31		2,726	0,230
	0,66		5,743	0,484
	1,09		9,501	0,801
	1,64		14,25	1,202
	1,76		14,67	1,238
R4	0,20	1,935	2,195	0,113
	0,31		2,735	0,141
	0,66		5,842	0,302
	1,09		9,664	0,499
	1,64		14,33	0,740
	1,76		14,62	0,755
R6	0,20	3,796	2,207	0,058
	0,31		2,756	0,073
	0,66		5,954	0,157
	1,09		9,997	0,263
	1,64		14,68	0,387
	1,76		14,78	0,389

Tabla 3.20 - Variación a lo largo del crecimiento de los parámetros de OTR_{max} , OUR_{max} y Da , para los experimentos R7 a R9.

Experimento	Cx (g/L)	$OTR_{max} \cdot 10^6$ (mol/L · s)	$OUR_{max} \cdot 10^7$ (mol/L · s)	Da (-)
R7	0,20	4,879	1,579	0,032
	0,31		1,937	0,040
	0,66		3,976	0,081
	1,09		6,619	0,136
	1,64		10,60	0,217
	1,76		10,77	0,221
R8	0,20	6,127	0,881	0,014
	0,31		1,049	0,017
	0,66		1,978	0,032
	1,09		3,226	0,053
	1,64		6,054	0,099
	1,76		6,489	0,106
R9	0,20	10,855	0,421	0,004
	0,31		0,492	0,005
	0,66		0,762	0,007
	1,09		1,324	0,012
	1,64		1,937	0,018
	1,76		2,030	0,019

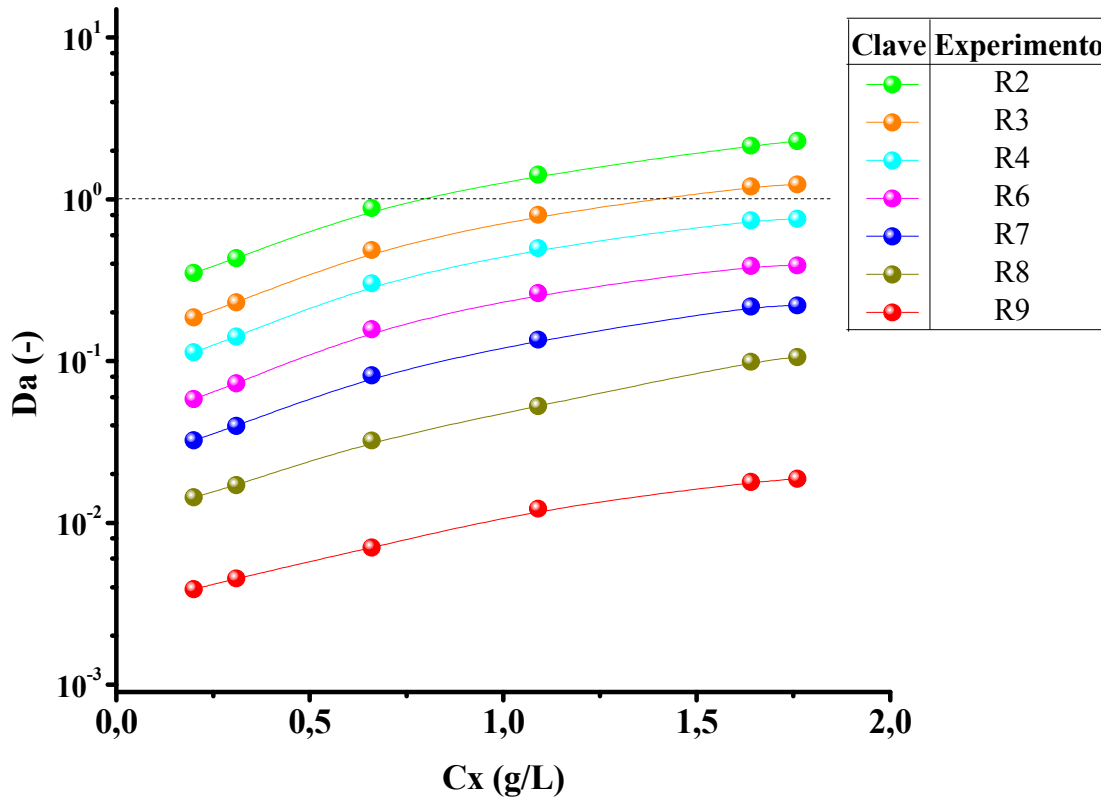


Figura 3.15 - Evolución del número de Damköhler con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación en del medio de cultivo.

3.3. MÉTODO RAPIDO para DETERMINAR CONDICIONES de ESTRÉS

Los estudios sobre los efectos y respuestas de las células al estrés hidrodinámico se han realizado, principalmente, con células de mamíferos (Papoutsakis, 1991; Papadaki y Eskin, 1997), plantas (Kieran y col., 2000) e insectos (Kamen y col., 1996; Palomares y Ramírez 1996). Sin embargo, la información sobre las respuestas de bacterias, las cuales son ampliamente usadas en una variedad de procesos industriales y que incluyen la producción de sustancias de alto valor añadido, es muy escasa. Como indican los resultados obtenidos en este trabajo, y en trabajos anteriores (García-Ochoa y col., 2013a y 2013b), también las bacterias pueden afectarse por estas condiciones.

Los principales estudios sobre los efectos del cizallamiento sobre células de bacterias se han realizado en biorreactores de tipo tanque agitado, en los cuales es difícil

separar estos efectos de los producidos por la transferencia de oxígeno (Edwards y col., 1989; Toma y col., 1991; Sahoo y col., 2003).

No obstante, ni siquiera los métodos de medida de estrés están claramente establecidos y aceptados, ya que se han propuesto procedimientos y sistemas muy distintos. Así, por ejemplo, Midler y Finn (1966) y Sahoo y col. (2003) emplearon viscosímetros de cilindros concéntricos, con flujo laminar de tipo *Coutte*; Soule y col. (1987), Janes y col. (1987) y Curran y Black (2004), utilizaron un biorreactor con flujo laminar; Wagner y Volgemann (1977), hicieron estudios en un biorreactor de tanque agitado, mientras que Bronnenmeier y Markl (1982), hicieron uso de un reactor *free-jet*. Por lo tanto, no existe ningún método sencillo propuesto para discriminar si un microorganismo, sea del tipo que sea, está sometido a estrés, si no es la observación de algún parámetro macroscópico (velocidad de crecimiento, de consumo de nutrientes, de producción de un servicio o un producto), lo que suele llevar consigo una abundante y larga experimentación, que puede llevar meses de trabajo.

Atendiendo a esta situación, en este trabajo se ha desarrollado un método con el que es posible determinar bajo qué condiciones hidrodinámicas, dentro de un bioproceso aerobio, pueden verse afectadas las células a causa del estrés hidrodinámico (sea éste producido por fenómenos de cizallamiento o por otros motivos) o pueden verse limitadas por fenómenos de mezcla o de transferencia de materia, principalmente de oxígeno. Para ello, se trata de conocer, a través de la medida del consumo de oxígeno, cómo varía q_{O_2} en función de las condiciones de transporte a una determinada concentración celular.

Este método, esquematizado en la Figura 3.16, se desarrolla en las siguientes cinco etapas:

1. Obtener la curva de crecimiento del microorganismo bajo condiciones de transporte e hidrodinámicas adecuadas (dadas, generalmente por una velocidad de agitación relativamente baja).
2. Teniendo en cuenta la curva de crecimiento, a una concentración celular determinada medir el consumo de oxígeno (OUR) aplicando el método dinámico clásico. A continuación, establecer diferentes condiciones

hidrodinámicas, modificando la velocidad de agitación (o el caudal de aire), y realizar medidas sucesivas del consumo de oxígeno.

3. Determinar el consumo específico de oxígeno, q_{O_2} , a la concentración celular prefijada, para las diferentes agitaciones o caudales.
4. Representar la variación de q_{O_2} en función de la variable de operación cuya influencia se desea conocer (velocidad de agitación o caudal de aire)
5. Realizar un análisis del resultado observado (caso 1 o 2) y determinar la condición hidrodinámica límite para el cultivo de células en estudio; es decir, determinando a partir de qué agitación q_{O_2} disminuye.

Aplicando este método al sistema en estudio, para el caso en el que se ha variado la velocidad de agitación, puede observarse que, si se representa la evolución del consumo específico de oxígeno en función de la velocidad de agitación (N) a una concentración celular de 0,31 g/L, se puede observar que una agitación de 450 rpm establece las condiciones hidrodinámicas límite en el biorreactor para el cultivo de las células de *R. erythropolis* (Figura 3.17). Velocidades de agitación superiores a 450 rpm, producirían unas condiciones que afectarían al microorganismo, ya sea un estrés hidrodinámico u oxidativo. Asimismo, como se puede observar en la Figura 3.18, si se realiza este estudio en diferentes etapas del crecimiento, los resultados obtenidos son análogos. Esto es, puede observarse que, independientemente de la concentración celular, la velocidad de agitación límite continúa siendo la misma, 450 rpm. En esta gráfica, al igual que en la 3.12, a medida que aumenta la edad celular disminuye q_{O_2} .

Para el caso en el que la variable a estudiar ha sido el caudal de aire, si se representa q_{O_2} en función de Q, a distintas concentraciones celulares (Figura 3.19), se puede observar que, independientemente de la concentración celular, el consumo específico permanece prácticamente constante: el microorganismo no parece, por tanto, verse afectado por las condiciones establecidas por el burbujeo del caldo de cultivo.

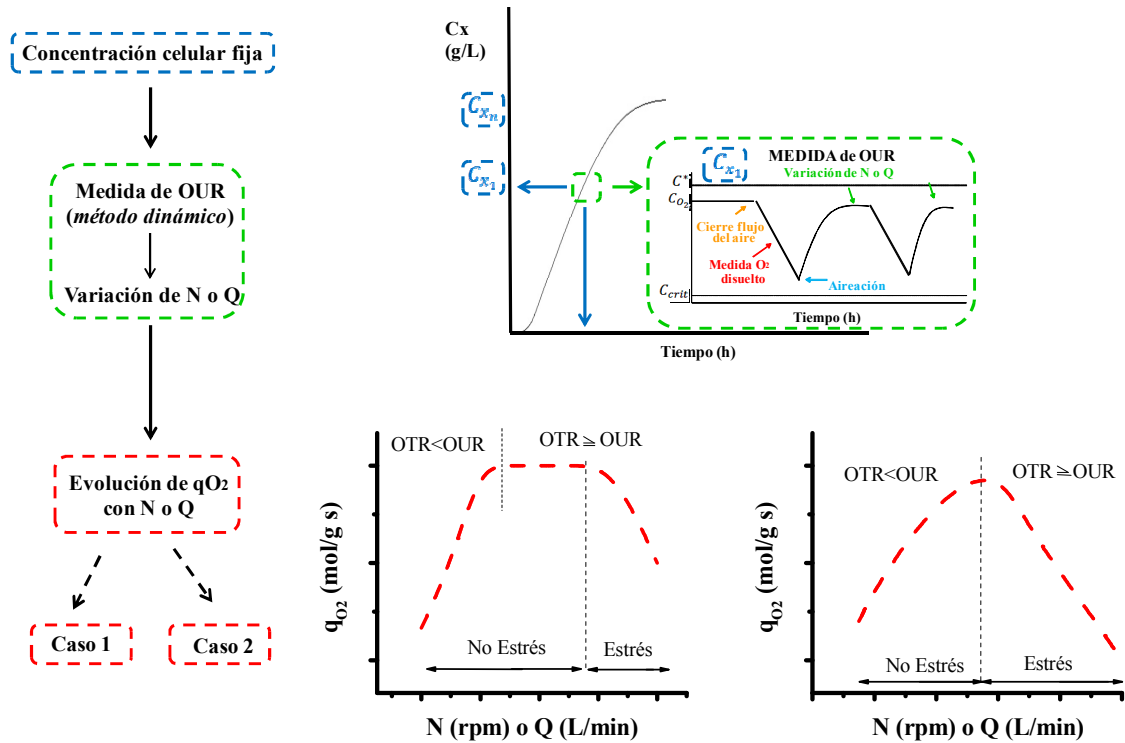


Figura 3.16 - Determinación del límite de estrés hidrodinámico a través de q_{O_2} .

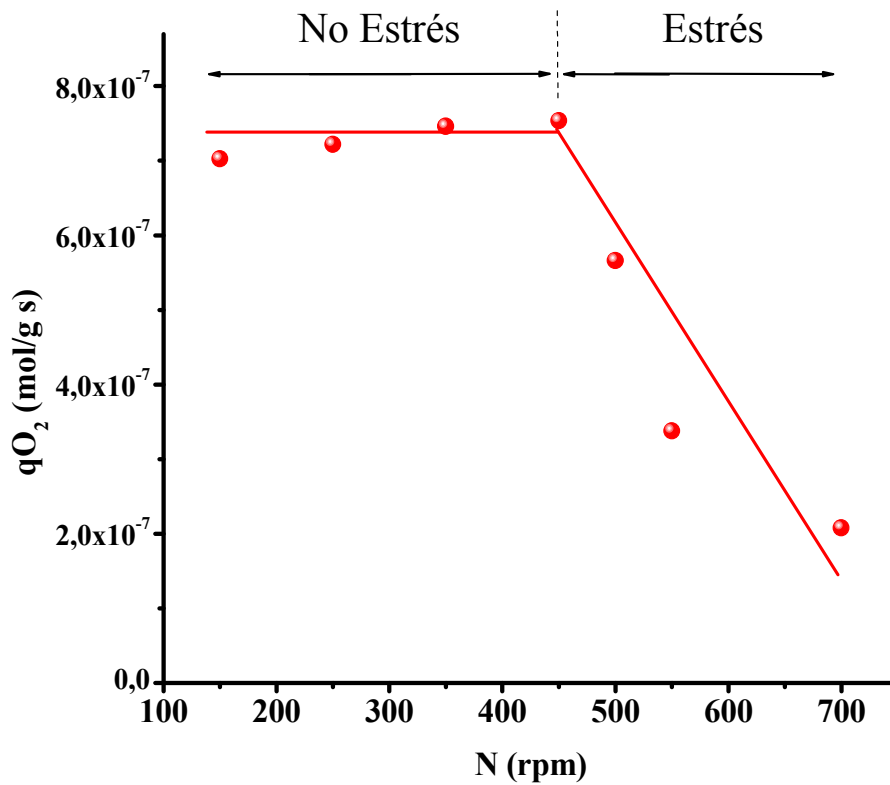


Figura 3.17 - Evolución de q_{O_2} con la velocidad de agitación a una concentración celular de 0,31 g/L.

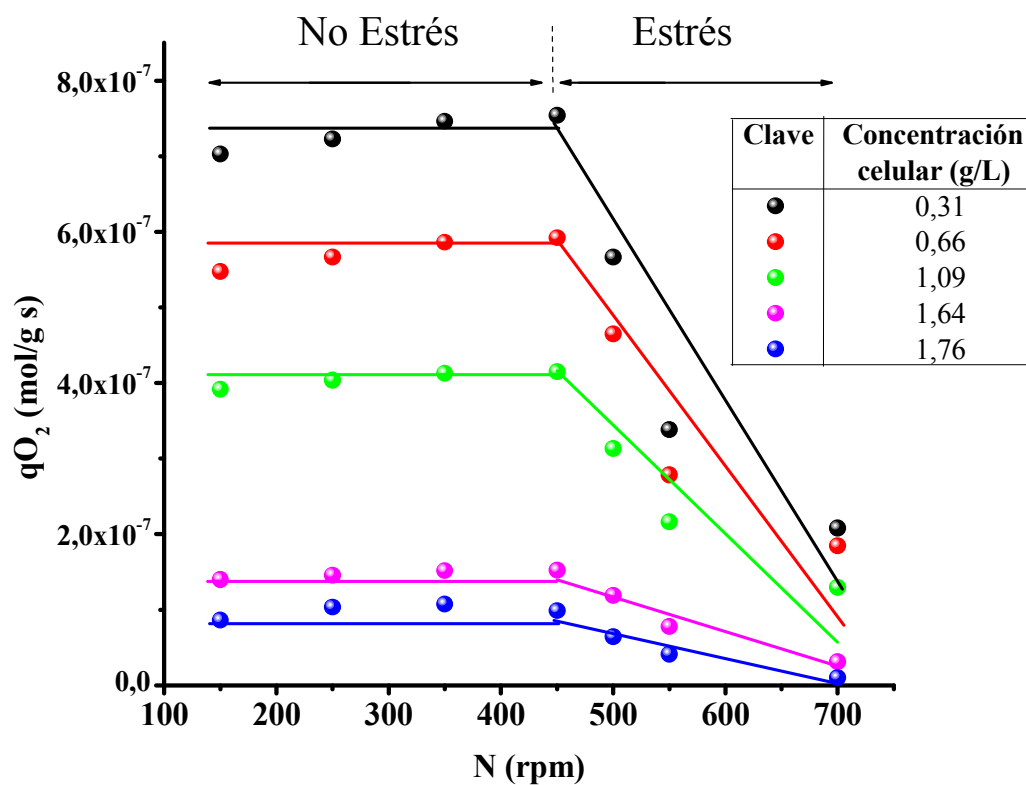


Figura 3.18 - Evolución de q_{O_2} con la velocidad de agitación a distintas concentraciones celulares.

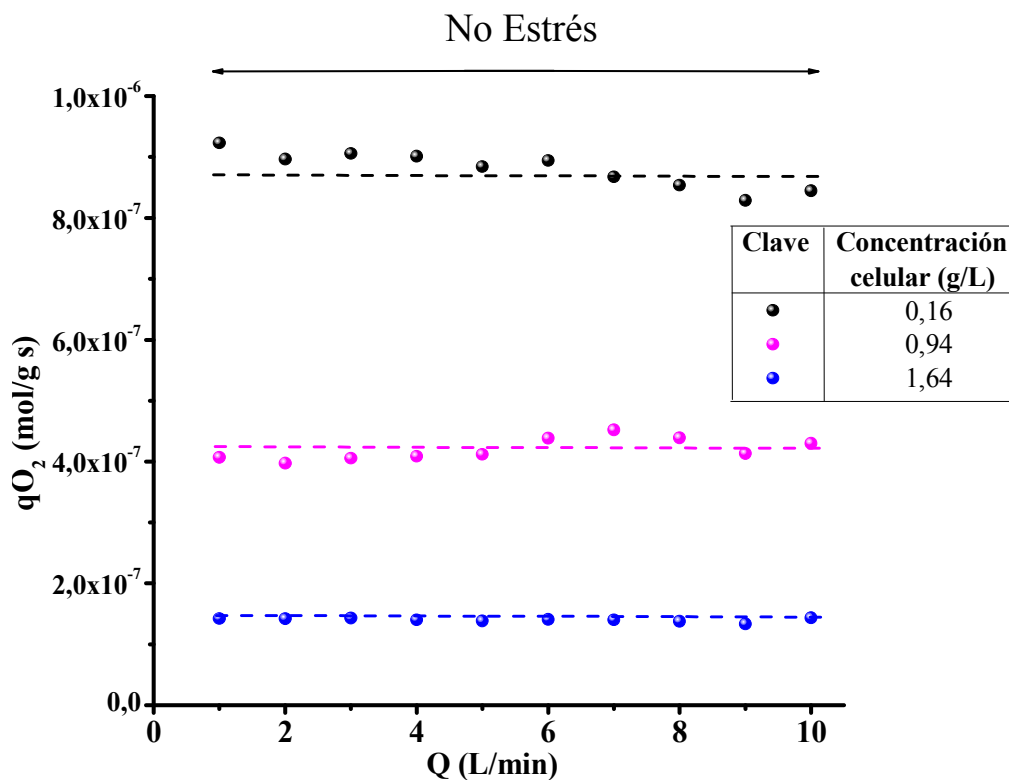


Figura 3.19 - Evolución la q_{O_2} con el caudal de aire a distintas concentraciones celulares.

3.4. BIBLIOGRAFIA

Abbad-Andaloussi, S.; Warzywoda, M. y Monot, F., **2003**. Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains. *Oil & Gas Science and Technology-Revue de Institut Francais du Petrole*. **58**, 505-513.

Alcon, A.; Santos, V.E.; Martin, A.B.; Yustos, P. y Garcia-Ochoa, F. **2005**. Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* **26**, 168-175.

Alonso, S.; Rendueles, M. y Díaz, M., **2012**. Role of dissolved oxygen availability on lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technol.* **109**, 140–147.

Atlas, R.M., **1994**. *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing, Nueva York (Estados Unidos).

Bronnenmeier, R. y **Märkl, H.**, **1982**. Hydrodynamic stress capacity of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 553-78.

Çalik, P.; Yilgör P.; Ayhan P. y Demir, A.S., **2004**. Oxygen effects on benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5075–5083.

Çalik, P.; Yilgör, P. y Demir, A.S., **2006**. Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 617-627

Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A.; Santos, V.E.; Diaz E.; Garcia J. y Garcia-Ochoa F., **2009a**. Analysis of Dibenzothiophene Desulfurization in a Recombinant *Pseudomonas putida* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 875–877.

Calzada, J.; Heras, S.; Alcon, A.; Santos, V.E. y Garcia-Ochoa F., **2009b**. Biodesulfurization of Dibenzothiophene (DBT) Using *Pseudomonas putida* CECT 5279: A Biocatalyst Formulation Comparison. *Energy Fuels.* **23**, 5491–5495.

Curran, S. J. y **Black, R. A.**, **2004**. Quantitative experimental study of shear stress and mixing in progressive flow regimes within annular-flow bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5859-5868.

- Doran, M.P., 2013.** Bioprocess. Eng principles. Academic Press Ltd., San Diego.
- Dunlop, E. y Namdev, P., 1993.** Effect of fluid forces on plant cell suspension. Proc. 3rd Int. Conf. on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, Nienow, A. (Ed.) Mechanical Eng. Pub. Ltd. London. **28**, 447-455.
- Edwards, N.; Beeton, S.; Bull, A. T. y Merchuk, J. C., 1989.** A Novel Device for the Assessment of Shear Effects on Suspended Microbial Cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**, 190-195.
- Garcia-Ochoa, F. y Gomez E., 2009.** Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. Biotechnol. Adv. **27**, 153-176.
- Garcia-Ochoa, F. y Santos, V. E., 1994a.** Cinética de transformaciones usando microorganismos: modelos cinéticos no estructurados. An. Quim. **90**, 7-17.
- Garcia-Ochoa, F. y Santos, V. E., 1994b.** Cinética de transformaciones usando microorganismos: modelos cinéticos estructurados y segregados. An. Quim. **90**, 17-30.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Santos, V. E. 2000.** Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. Enzyme Microb. Technol. **27**, 680-690.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez E.; Santos, V. E. y Merchuk, J.C., 2010.** Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. Biochem. Eng. J. **49**, 289-307.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V. E., 2013a.** The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. Bioprocess and Biosyst. Eng. **36**, 911-925
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Escobar, S. y Santos, V. E., 2013b.** Influence of oxygen uptake rate on *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 growth rate and biodesulfurization capacity: limit on the fluid dynamic conditions. Comunicacion, 9th European Congress of Chemical Engineering and 2th European Congress of Applied Biotechnology, La Haya-Holanda, Abril 21-25.
- Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., 2006.** Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability, Chem. Eng. Sci. **61**, 4595-4604.

- Henzler, H.J., 2000.** Particle stress in bioreactors. In: Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **34**, 35-82.
- Hewitt, C.J.; Boon, L.A., McFarlane, C.M., Nienow, A.W., 1998.** The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. Biotechnol. Bioeng. **59**, 525-656.
- Hodaifa, G.; Martinez, M.E.; Orpezc, R. y Sanchez, S. 2010.** Influence of hydrodynamic stress in the growth of *Scenedesmus obliquus* using a culture medium based on olive-mill wastewater. Chem. Eng. Process. **49**, 1161-1168.
- Janes, D. A.; Thomas, N. H. y Callow, J. A., 1987.** Demonstration of a bubble-free annular vortex membrane bioreactor for batch culture of red beet cells. Biotechnol. Techn. **1**, 257-262.
- Kamen, A.A.; Bedard C.; Tom R.; Perret S. y Jardin B., 1996.** On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures, Biotechnol. Bioeng. **50**, 36-48.
- Kaya-Çeliker, H.; Angardi, V. y Çalık, P., 2009.** Regulatory effects of oxygen transfer on overexpression of recombinant protein by *Escherichia coli* BL21 (DE3). Biotechnol. J. **4**, 1066-1076.
- Kieran, P.M.; Malone, D.M. y MacLoughlin P.F., 2000.** Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **67**, 139-177.
- Kilbane, II, J. J. y Jackowski, K., 1992.** Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, Biotechnol. Bioeng. **40**, 1107-1114.
- Kirimura, K.; Harada, K.; Iwasawa, H.; Tanaka, T.; Iwasaki, Y.; Furuya, T.; Ishiim Y. y Kino, K., 2004.** Identification and functional analysis of the genes encoding dibenzothiophene-desulfurizing enzymes from thermophilic bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**, 703-713.

Kirimura, K.; Furuya, T.; Nishii, Y.; Ishii, Y.; Kino, K. y Usami, S., **2001**. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B, J. Biosci. Bioeng. **91**, 262-266.

Kocabas, P.; Calık, P. y Özdamar, T.H., **2006**. Fermentation characteristics of l-tryptophan production by thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* in a defined medium, Enzyme Microb. Technol. **39**, 1077-1088.

Li, H.; Xu, H.; Li, S.; Feng, X.; Xu, H. y Ouyang, P., **2011**. Effects of dissolved oxygen and shear stress on the synthesis and molecular weight of welan gum produced from *Alcaligenes sp.* CGMCC2428. Process. Biochem. **46**, 1172-1178.

Märk, H. y **Bronnenmeier**, R., **1985**. Mechanical stress and microbial production. In Rehm HJ, Reed G Biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. **14**, 369-392.

Märk, H.; Bronnenmeier, R. y Wittek, B., **1991**. The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. Int. Chem. Eng. **31**, 185-197.

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. E. y Garcia-Ochoa F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. Energy Fuels. **18**, 851-857.

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. y Garcia-Ochoa F., **2005**. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: influence of the operational conditions. Energy Fuels. **19**, 775-782.

McCloskey, K.E., **2011**. Effects of Shear Stress on Cells. Comprehensive Biotechnol. **1**, 615-623.

Mehmood, N.; Olmos, E.; Marchal, P.; Goergen, J.L. y Delaunay, S. **2010**. Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{La} . Process. Biochem. **45**, 1779-1786.

Midler, M. y **Finn**, R. K., **1966**. A model system for evaluating shear in the design of stirred fermenters. Biotechnol. Bioeng. **8**, 71-84.

- Nielsen, J.**; Villadsen, J. y Liden, G., **2003**. Bioreaction engineering principles, Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York. 528.
- Nuju, A.A.**, **2012**. Bio-catalytic desulfurization of fossil fuels: a mini review. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. Online.
- Ohshiro, T.**; Hirata, T.; Hashimoto, I. e Izumi, Y., **1996**. Characterization of DBT desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon. J. Ferment. Bioeng. **82**, 610-612.
- Olmo, C.H.**; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005a**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. Enzyme Microb. Technol. **37**, 157-166.
- Olmo, C.H.**; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005b**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. Biochem. Eng. J. **22**, 229-237.
- Olmos, E.**; Mehmood, N.; Haj Husein, L.; Goergen, J.; Fick, M. y Delaunay, S., **2013**. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*. Bioprocess Biosyst. Eng. **36**, 259-272.
- Palomares, L.A.** y **Ramirez O.**, **1996**. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. Cytotechnology. **22**, 225-237.
- Papadaki, M.** y **Eskin, S.G.**, **1997**. Effects of Fluid Stress on Gene Regulation of Vascular Cells. Biotechnol. Prog. **13**, 209-221.
- Papoutsakis, E. T.**, **1991**. Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. TIBTECH. **9**, 427-437.
- Pearl, R.** y **Reed, L. J.**, **1920**. On the rate growth of th populetion of the United States since 1790 and its mathematical representation. PNAS. **6**, 275-288.
- Pinches, A.** y **Pallent, L.J.**, **1986**. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. Biotechnol. Bioeng. **28**, 1484-1496.

Pirt, S.J., 1965. Maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proceedings of the Royal Society. London. B. **163**, 224-231.

Pirt, S.J., 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Arch. Microbiol. **133**, 300-302.

Prokop, A. y Bajpai, R., 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. Adv. App. Microbiol. **37**, 165-232.

Sahoo, S.; Verma, R.K.; Suresh, A.K.; Rao, K.K.; Bellare J. y Suraishkumar G.K., 2003. Macro-Level and Genetic-Level Responses of *Bacillus subtilis* to Shear Stress. Biotechnol. Prog. **19**, 1689-1696.

Santos, V. E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F., 2006. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. Biochem. Eng. J. **32**, 198-204.

Soule, J. C.; Wilhelm, A. M.; Riba, J. P. y Ambid, C., 1987. Bioréacteur à contraintes mécaniques contrôlés. Application à la culture in vitro de cellules végétales. Entropie, **23**, 24-31.

Toma, M.K.; Ruklisha, M.P.; Venags, J.J.; Zeltina, M.O.; Leite, M.P.; Galinina, N.I.; Viesturs, U.E. y Tengerdy, R.P., 1991. Inhibition of Microbial Growth and Metabolism by Excess Turbulence. Biotechnol. Bioeng. **38**, 552-556.

Trujillo-Roldan, M.A. y Valdez-Cruz N.A., 2006. Hydrodynamic stress: death and cellular damage in agitated cultures. Rev. Latinoam. Microbiol. **48**, 269-280.

Wagner, F. y Vogelmann, H., 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. Plant tissue culture and its biotechnological application. Ed. Barz W, Reinhard E, Zenk MH. 245.

Yépez, B.O. y Maugeri, F., 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. Enzyme Microb. Technol. **36**, 717-724.

CAPÍTULO 4.
CRECIMIENTO DE *Pseudomonas*
putida

CAPÍTULO 4

CRECIMIENTO DE *Pseudomonas putida*

Entre las bacteria del género *Pseudomonas*, la especie *P. putida* es una de las cepas de mayor interés industrial debido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos. Se seleccionó como biocatalizador, con aplicabilidad industrial en la BDS, por ser uno de los microorganismos más abundantes de los encontrados en el petróleo (Leahy y Colwell, 1990) y por su alta resistencia, tanto a los disolventes orgánicos (Inoue y Horikoshi, 1991) como a los metales pesados presentes en las fracciones de combustibles (Atlas, 1994). Además, el conocimiento de su genoma ha permitido disponer de una gran variedad de herramientas para la mejora de sus características, mediante manipulación genética (de Lorenzo y Timmis, 1994).

La bacteria *P. putida* KTH2 es un organismo modificado genéticamente capaz de expresar los genes de la ruta 4S para desulfurar el DBT. Esta bacteria (y otra muy similar: *P. putida* CECT5279), al igual que *R. erythropolis* IGTS8, ha sido ampliamente utilizada por el grupo de investigación FQPIMA en diferentes trabajos orientados a la mejora de la eficiencia del proceso de biodesulfuración (Martin y col., 2004 y 2005; Alcon y col., 2005; Olmo y col., 2005a y 2005b; Gomez y col., 2006a y 2006b; Santos y col., 2007; Calzada y col., 2009a y 2009b). Entre estos estudios cabe destacar el llevado a cabo por Gomez y col. (2006a), en el que se puso de manifiesto que, tanto el crecimiento como la capacidad desulfurante de las células, se ven afectados por la

disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio y, por tanto, por las condiciones de operación del biorreactor (la velocidad de agitación y caudal de aire).

Por otro lado, los resultados obtenidos en cultivos *R. erythropolis* IGTS8, han puesto de manifiesto la estrecha relación que existe entre la respuesta fisiológica de este microorganismo y las condiciones hidrodinámicas del biorreactor. Así, se ha observado que cuando se aumenta la velocidad de agitación (a la hora de optimizar la transferencia de oxígeno, por ejemplo), se alcanza un límite hidrodinámico, a partir del cual el comportamiento del microorganismo cambia. Asimismo, estudios preliminares realizados en cultivos de *P. putida* han puesto de manifiesto que las condiciones de operación influyen de forma relevante en la evolución del mismo, aunque, hasta ahora, no se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva del efecto de la agitación sobre su crecimiento.

El objeto de este capítulo es determinar la respuesta de los cultivos de *P. putida* KTH2 en diferentes condiciones hidrodinámicas del biorreactor, al aumentar la velocidad de agitación. Asimismo, y a través de la medida de los parámetros del crecimiento y del consumo (tomados como respuesta de las células) en función de la agitación, se pretende determinar qué cambios macroscópicos tienen lugar en el crecimiento y en qué extensión se producen. Asimismo, se pretende diferenciar si son consecuencia de las limitaciones a la transferencia del oxígeno o a los efectos hidrodinámicos, resultado de los fenómenos asociados a la fluidodinámica del biorreactor. Estos estudios permitirían conocer cómo minimizar las restricciones debidas a la transferencia de materia y a los efectos del estrés. En un capítulo posterior de la presente Memoria, se estudiará en qué medida se ve afectada la capacidad de desulfuración, como un indicador de alteración del metabolismo celular.

Además, para comprobar si el comportamiento encontrado en *P. putida* KTH2, un GMO, era distinto del de la cepa natural, se ha realizado un estudio similar del crecimiento de esta última.

4.1. CINÉTICA del CRECIMIENTO de *Pseudomonas putida* KTH2: VARIACIÓN de los PARÁMETROS del CULTIVO

Con el fin de estudiar los aspectos antes citados y tratando de determinar una respuesta fisiológica indicativa de una situación de estrés, se han llevado a cabo distintos experimentos, cultivando células de *P. putida* KTH2 en operación discontinua en matraz *Erlenmeyer* y en un biorreactor tipo tanque agitado y aireado.

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en los cultivos de *R. erythropolis*, en este caso se ha modificado únicamente la agitación, pero ha sido necesario hacerlo en un amplio intervalo de velocidades, de 100 a 2000 rpm. Así mismo, con el fin de disponer de una mayor información del crecimiento de *P. putida* KTH2, en el diseño experimental se ha considerado necesario medir, además de la evolución de la biomasa y del oxígeno disuelto, otros parámetros característicos del crecimiento celular. Así, se ha medido la evolución del consumo de la fuente de carbono -glicerol y ácido glutámico-, como magnitudes características del cultivo. En un trabajo anterior (Martin y col., 2004), se estudió la influencia del pH sobre el crecimiento de *P. putida* en incubadora orbital, estableciéndose que las células crecen más rápido y desarrollan mayor capacidad de biodesulfuración cuando son cultivadas en medio BSM sin tamponar, utilizando ácido glutámico como sustrato carbonado. Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún estudio que muestre la evolución de este parámetro bajo diferentes condiciones de operación en el fermentador. Teniendo en cuenta que durante el crecimiento los microorganismos modifican la acidez del medio de cultivo, y que éste puede afectar de forma importante a la velocidad de crecimiento de los microorganismos, se ha medido la evolución del pH bajo las condiciones estudiadas.

Finalmente, se ha realizado un estudio de la velocidad de transporte y de consumo de oxígeno en las mismas condiciones, de una forma similar a lo hecho en el capítulo anterior para *R. erythropolis*, aunque en el caso de *Pseudomonas putida*, debido a su enorme velocidad de consumo de oxígeno, será necesario aplicar métodos modificados o adaptados.

4.1.1. Resultados experimentales

Las condiciones de cultivo de *P. putida* KTH2 han sido optimizadas en trabajos previos y mantenidas en este trabajo. Así, Martín y col. (2004 y 2005) estudiaron los diferentes medios de crecimiento y las condiciones de operación necesarias para maximizar la cantidad de biomasa y la capacidad desulfurante, respectivamente. De acuerdo a estos estudios, con el fin de obtener resultados experimentales reproducibles y una fase de latencia pequeña -con una mayor concentración de biomasa-, se preparó el inóculo del biorreactor en dos etapas, haciendo crecer las células en incubadora y llevando a cabo un preinóculo y, posteriormente, el inóculo.

En la Tabla 4.1 se muestran, de forma abreviada, los experimentos realizados y las condiciones de operación utilizadas en cada uno de ellos. En todos los casos, el medio de crecimiento ha sido el descrito en el Apartado 2.1.3 de la presente Memoria y la temperatura se ha mantenido en 30 °C. Durante el crecimiento en fermentador, se ha seguido el procedimiento experimental descrito en el Apartado 2.3.1.3 y se ha registrado en línea la evolución del pH, de la temperatura, de la agitación, del caudal de aire y del porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo. A su vez, se han extraído, a tiempos regulares, muestras del medio, en condiciones de esterilidad, para el análisis de las concentraciones de biomasa y de las fuentes de carbono (glicerol y ácido glutámico).

Los resultados experimentales de las diferentes variables medidas durante el crecimiento de *P. putida* KTH2, bajo las condiciones de operación descritas en la Tabla 4.1, se muestran en las Tablas 4.2 a 4.12. Así, en las Tablas 4.2 y 4.3 se recogen los resultados de la evolución de la concentración celular, medida como peso seco, y en las Tablas 4.4 a 4.7 se muestran los valores experimentales de la evolución del oxígeno disuelto. En cuanto al consumo de las fuentes de carbono, en las Tablas 4.8 y 4.9 se dan la evolución de la concentración de glicerol y, en las Tablas 4.10 y 4.11 la del ácido glutámico. Finalmente, en la Tabla 4.12 se muestran los valores experimentales de la evolución del pH a lo largo del crecimiento en los diferentes experimentos.

Debido a la tendencia de los cultivos de *P. putida* KTH2 a formar espumas durante su crecimiento en fermentador -no evitable mediante la adición de un antiespumante-, fue necesaria la utilización de un dispositivo mecánico para su eliminación: un disco rompe espumas, que en su movimiento giratorio introduce un

esfuerzo cortante adicional capaz de disgregar la dispersión G-L. Este dispositivo es capaz de controlar la formación de espumas a velocidades de agitación bajas, desde 100 hasta 500 rpm. Sin embargo, en los cultivos realizados a velocidades de agitación más elevadas, se observó que no era lo suficientemente eficaz, ya que a partir de las 9 horas de experimentación, la cantidad de espuma formada sobrepasaba el disco, llegando hasta el límite superior de la cuba; y, a las 10 horas de crecimiento, se perdía caldo de cultivo (y biomasa) a través del condensador. Para resolver este problema experimental, para velocidades de agitación altas (de 600 a 2000 rpm, experimentos P8 a P13), se llevó a cabo el cultivo con solo 1 L de volumen de medio. Como puede observarse en la Tabla 4.3, los experimentos llevados a cabo en estas condiciones completaban su crecimiento (hasta las 16 horas). Si se comparan los resultados obtenidos para las velocidades de agitación de 600 y 700 rpm (experimentos P8 y P9), con los realizados con 2 L de volumen (experimentos P6 y P7) se puede comprobar que los crecimientos son muy similares.

Tabla 4.1 - *Condiciones hidrodinámicas establecidas para el cultivo de P. putida KTH2 en biorreactor de tipo tanque agitado.*

Experimento	Velocidad de agitación (rpm)	Volumen de líquido (L)	Caudal de aire (L/min)
P1	100	2	2
P2	200	2	2
P3	300	2	2
P4	400	2	2
P5	500	2	2
P6	600	2	2
P7	700	2	2
P8	600	1	1
P9	700	1	1
P10	800	1	1
P11	1400	1	1
P12	1600	1	1
P13	2000	1	1
P14 (Incubadora)	210	0,050	--

Tabla 4.2 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P1 a P7.

Tiempo (h)	Concentración celular, Cx (g/L)						
	Código Experimento						
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
0	0,11	0,09	0,11	0,12	0,12	0,13	0,13
1	0,22	0,22	0,22	0,21	0,24	0,26	0,26
2	0,35	0,37	0,43	0,46	0,46	0,38	0,41
3	0,42	0,49	0,58	0,71	0,79	0,65	0,67
4	0,51	0,61	0,76	0,82	1,05	0,81	1,03
5		0,70	0,90	1,06	1,40	1,32	1,38
6	0,69	0,77	1,06	1,24	1,65	1,75	1,80
7		0,89	1,19		1,97	2,34	2,28
8	0,81	0,98	1,29	1,53	2,28	3,03	2,98
9		1,04	1,40			3,34	3,52
10	0,91	1,12	1,51	1,91	2,73	3,76	3,78
11					3,25		
12	0,96		1,68	2,27	3,26		
13		1,37			3,50		
14					3,57		
15	1,08	1,48	2,06	2,84	3,65		
18		1,61	2,25	3,17			
19	1,18						
21		1,72	2,48	3,30			
22	1,30						
23			2,55				
24	1,36	1,78		3,42			
26	1,39		2,58				
28		1,85	2,64				
30	1,44	1,86	2,66				

Tabla 4.3 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P8 a P14.

Tiempo (h)	Concentración celular, Cx (g/L)						
	Código Experimento						
	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
0	0,13	0,12	0,13	0,11	0,13	0,13	0,12
1	0,26	0,27	0,25	0,26	0,26	0,25	0,18
2	0,43	0,44	0,43	0,41	0,41	0,41	0,41
3	0,73	0,74	0,77	0,70	0,70	0,73	0,72
4	0,91	0,96	0,98	0,92	0,98	0,99	1,09
5	1,31	1,33	1,34	1,17	1,26	1,32	1,37
6	1,69	1,91	1,80	1,70	1,68	1,82	1,57
7	2,31	2,46	2,36	2,16	2,25	2,33	1,84
8	2,70	3,02	2,91	2,87	2,87	2,80	2,05
9	3,36	3,51	3,64	3,64	3,39	3,23	2,33
10	3,74	3,84	3,90	4,00	3,83	3,78	2,54
11	4,47	4,47	4,47	4,37	4,34	4,43	2,76
12	4,51	4,66	4,71	4,83	4,64	4,43	2,94
14	4,83	4,92	5,01	5,06	4,99	4,95	3,16
15							3,29
16	4,93	5,04	5,16	5,11	5,12	5,16	
17							3,41

Tabla 4.4 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P1 a P3.

Experimento P1		Experimento P2		Experimento P3	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	92,10	0,00	98,90	0,00	99,30
0,10	73,70	0,25	62,80	0,15	88,70
0,20	57,10	0,50	51,20	0,57	65,30
0,30	39,90	0,75	37,50	1,07	49,00
0,40	28,70	1,00	22,80	2,00	34,00
0,60	15,90	1,50	10,10	3,00	22,00
0,70	8,60	2,00	0,00	5,00	0,00
1,00	2,90	4,00	0,00	6,50	0,00
1,61	1,50	5,00	0,00	8,00	0,00
2,50	1,40	6,00	0,00	11,50	0,00
3,00	1,10	8,00	0,00	12,00	0,00
4,60	0,80	9,30	0,00	15,00	0,00
6,00	0,00	12,00	0,00	17,50	0,00
9,00	0,00	15,00	0,00	18,00	0,00
10,00	0,00	17,00	0,00	21,00	0,00
12,00	0,00	18,00	0,00	23,00	0,00
15,50	0,00	21,00	0,00	26,00	0,00
19,00	0,00	24,00	0,00	28,00	0,00
22,00	0,00	27,00	0,00	30,00	0,00
25,00	0,00	30,00	0,00		
29,00	0,00				
30,00	0,00				

Tabla 4.5 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P4, P5 y P8.

Experimento P4		Experimento P5		Experimento P8	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	97,40
0,50	88,71	1,61	85,00	1,00	94,00
1,00	77,15	2,52	67,00	2,01	86,00
1,51	65,30	3,00	53,66	3,00	76,00
2,25	49,00	5,00	28,00	4,00	63,00
3,10	39,00	6,11	18,00	5,00	50,60
5,00	16,00	6,82	12,00	6,00	42,00
7,00	0,00	7,54	5,30	7,00	32,00
8,00	0,00	8,00	2,00	8,00	29,00
10,00	0,00	8,42	0,00	9,00	31,70
12,00	0,00	10,50	0,00	10,04	44,30
14,00	0,00	11,00	0,00	12,00	72,00
16,00	0,00	12,00	2,10	13,00	88,00
18,00	0,00	14,00	14,00	14,00	96,00
20,00	0,00	15,00	25,00	15,00	98,00
22,00	0,00	16,00	32,50	16,00	99,50
23,50	4,40	17,00	44,00		
24,00	25,50	18,00	57,00		
24,91	43,10	19,00	67,50		
26,00	57,80	20,00	75,00		
27,00	77,60	21,00	82,00		
28,00	95,70	22,00	90,00		

Tabla 4.6 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P9 a P11.

Experimento P9		Experimento P10		Experimento P11	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	99,10	0,00	99,80	0,00	100,00
0,50	97,80	1,00	97,80	1,00	99,80
1,00	96,60	2,00	95,20	2,00	98,80
1,50	94,80	3,00	89,50	3,00	96,90
2,00	94,30	4,00	83,90	5,00	94,40
2,50	91,80	5,00	79,30	6,00	92,70
3,00	88,10	6,00	74,90	7,00	91,70
3,50	82,40	7,00	72,00	8,00	91,50
4,00	71,80	8,00	70,60	9,00	92,30
4,50	67,30	9,00	72,90	10,00	93,70
5,00	60,30	10,00	78,60	11,00	95,90
5,42	56,30	11,00	86,00	12,00	98,30
6,17	52,50	12,00	92,80	13,00	99,40
6,56	51,60	13,00	97,00	15,00	99,80
7,03	50,00	16,00	99,60		
8,02	47,47				
8,50	47,60				
9,05	52,40				
9,55	57,50				
10,00	60,50				
11,00	67,90				
12,00	74,30				
13,00	82,10				
14,00	89,70				
15,00	98,00				

Tabla 4.7 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P12 y P13.

Experimento P12		Experimento P13	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	100,00
1,00	99,55	1,00	99,90
2,00	98,77	2,00	99,40
3,00	97,70	3,00	98,70
4,00	96,50	4,00	98,00
5,00	95,80	5,00	97,50
6,00	95,10	6,00	97,10
7,00	94,33	7,00	96,70
8,00	94,18	8,00	96,65
9,00	94,55	9,00	96,90
10,00	95,90	10,00	97,50
11,00	97,20	11,00	98,40
12,00	98,35	12,00	99,20
14,00	99,50	14,00	99,80
15,00	99,70	15,00	99,90
16,00	99,90	16,00	99,90

Tabla 4.8 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P1 a P5 y P8.

Tiempo (h)	Concentración de glicerol, (g/L)					
	Código Experimento					
	P1	P2	P3	P4	P5	P8
0	1,99	2,00	2,01	1,99	2,02	2,02
1		2,00	2,00			
2	1,99	1,98	1,97	1,96	1,95	1,93
3	1,98	1,97	1,95		1,89	1,86
4	1,97	1,95		1,89	1,80	1,76
5	1,95	1,91	1,87	1,79	1,68	1,61
6		1,86	1,79	1,69	1,54	1,48
7	1,90	1,80		1,57	1,32	
8		1,75	1,63	1,45	1,09	0,94
9	1,84	1,70	1,54		0,86	0,59
10	1,80	1,64		1,20	0,56	
11		1,56	1,35	1,04	0,29	0,03
12	1,69	1,51		0,89	0,00	
13		1,44	1,15	0,70		
14	1,57		1,05			
15				0,30		
16		1,24		0,00		
17	1,41	1,15	0,72			
19	1,23	1,01	0,47			
20			0,33			
21		0,78	0,20			
22	1,00		0,00			
23		0,56				
24	0,83	0,49				
26	0,69	0,23				
27		0,09				
28		0,00				
30	0,25					

Tabla 4.9 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P9 a P14.

Tiempo (h)	Concentración de glicerol, (g/L)					
	Código Experimento					
	P9	P10	P11	P12	P13	P14
0	1,95	1,93	1,96	1,95	1,93	2,03
1		1,92	1,94	1,92	1,88	
2	1,88	1,91	1,90	1,96	1,92	1,96
3	1,82	1,86	1,84	1,88	1,87	
4		1,76	1,78	1,79	1,73	1,85
5	1,54	1,62	1,59	1,62	1,59	
6	1,28		1,35	1,36	1,28	1,58
7	0,91	0,88	1,04	1,01	0,85	1,42
8	0,44	0,58	0,61	0,62	0,55	1,28
9		0,10	0,19		0,10	
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86
11						0,63
12						0,40
14						0,00

Tabla 4.10 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P1 a P5 y P8.

Tiempo (h)	Concentración de ácido glutámico, (g/L)					
	Código Experimento					
	P1	P2	P3	P4	P5	P8
0	20,09	20,05	20,08	20,09	20,09	20,07
1		20,02	20,00			20,10
2	20,09	20,01		19,89	19,89	
3	20,09		19,93		19,83	19,60
4	19,96	19,92		19,83	19,66	19,44
5	19,93	19,88	20,04	19,77		19,21
6		19,85	19,75	19,48	18,84	18,74
7	19,88	19,77	19,58		18,26	17,98
8		19,66	19,36	18,83		
9	19,78		19,09		16,78	
10	19,69	19,35		17,78		14,77
11		19,20	18,49	17,28	14,72	
12	19,54	19,07		16,60	13,43	11,89
13			17,90			
14	19,40		17,58			8,98
15		18,58		15,07	10,91	
16				14,57		7,49
17	19,25	18,28	16,80			
19	19,10		16,15	12,18		
20			15,88			
21		17,59		10,86		
22	18,95		15,21			
24	18,80	17,18		9,10		
25			14,10			
26	18,65					
27		16,63	12,96			
30	18,01	15,70	11,28			

Tabla 4.11 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P9 a P14.

Tiempo (h)	Concentración de ácido glutámico, (g/L)					
	Código Experimento					
	P9	P10	P11	P12	P13	P14
0	20,04	20,12	20,10	20,03	20,06	20,10
1					20,01	20,01
2		19,64	19,74	19,68	19,72	
3	19,53	19,49		19,46		20,01
4	19,30	19,27	19,34	19,27	19,31	19,74
5	18,98	18,96	19,00	18,93	18,92	19,58
6	18,27	18,35	18,44	18,21		
7	17,21	17,45		17,30	17,26	18,74
8	16,04	16,47	16,13	16,06		18,32
9	14,89				14,87	17,81
10	13,58	13,42	13,54	12,80	13,15	16,66
12	10,02	9,86		9,52	9,37	15,03
14	7,97	7,67	7,75		7,29	13,23
16	6,60	6,46	6,52	6,57	6,13	
17						11,14

Tabla 4.12 - Evolución del pH durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación para los experimentos P1 a P13.

Tiempo (h)	pH										
	Código Experimento										
	P1	P2	P3	P4	P5	P8	P9	P10	P11	P12	P13
0	6,23	6,30	6,42	6,43	6,44	6,45	6,50	6,39	6,46	6,42	6,46
1	6,26	6,36	6,47	6,49	6,50	6,51	6,56	6,45	6,53	6,42	6,46
2	6,30	nd	6,53	6,53	6,55	6,57	6,62	6,52	6,57	6,49	6,48
3	6,34	6,45	6,58	6,61	6,66	6,67	6,74	6,64	6,70	6,60	6,55
4	6,38	6,49	6,64	6,66	6,79	6,84	6,90	6,82	6,84	6,79	6,74
5	6,42	6,52	6,70	6,74	6,93	6,94	7,08	7,04	7,02	7,00	6,95
6	6,46	6,57	6,76	6,81	7,09	7,19	7,28	7,26	7,21	7,21	7,16
7	6,50	6,61	6,83	6,92	7,27	7,44	7,51	7,48	7,43	7,49	7,44
8	6,54	6,64	6,89	7,02	7,39	7,57	7,74	7,64	7,65	7,76	7,71
9	6,58	6,68	6,96	7,13	7,56	7,76	7,89	7,80	7,85	7,88	7,92
10	6,62	6,72	7,03	7,24	7,73	7,95	8,19	8,04	8,24	8,14	8,18
11	6,65	6,75	7,11	7,34	7,86	8,19	8,35	8,28	8,26	8,32	8,36
12	6,68	6,80	7,18	7,44	8,06	8,33	8,46	8,38	8,44	8,42	8,46
13	6,72	6,85	7,25	7,52	8,16	8,40	8,56	8,45	8,54	8,50	8,54
14	6,75	6,89	7,31	7,60	8,24	8,45	8,62	8,50	8,63	8,54	8,61
15	6,79	6,95	7,39	7,70	8,34	8,51	8,69	8,56	8,70	8,60	8,67
16	6,83	6,99	7,46	7,80		8,59	8,74	8,62	8,76	8,66	8,73
17	6,88	7,02	7,50	7,93							
18	6,92	7,07	7,55	8,05							
19	6,96	7,11	7,63	8,12							
20	7,00	7,17	7,69	8,20							
21	7,03	7,21	7,75	8,26							
22	7,06	7,26	7,85	8,33							
23	7,10	7,32	7,93	8,38							
24	7,13	7,36	7,99	8,43							
25	7,16	7,39	8,07								
26	7,19	7,44	8,14								
27	7,23	7,53	8,19								
28	7,26	7,60	8,26								
29	7,29	7,65	8,30								
30	7,32	7,73	8,34								

4.1.1.1. Discusión de los resultados

Para un adecuado análisis y una mejor interpretación de los datos experimentales del crecimiento, los valores de las Tablas 4.2 y 4.3 se han representado en la Figura 4.1. En la citada figura, se pueden distinguir dos comportamientos en la evolución de la biomasa, dependiendo de la velocidad de agitación a la que se ha realizado el cultivo. Por un lado, para velocidades de agitación bajas (de 100 a 500 rpm), no existe fase de latencia y el crecimiento se inicia desde su fase exponencial. Por el contrario, en los cultivos llevados a cabo a velocidades de agitación altas (de 600 a 2000 rpm), se observa el comportamiento típico del crecimiento celular, con una fase de latencia, de aproximadamente 2 h, un crecimiento exponencial, de 12 a 14 h de duración, y una fase estacionaria, que se mantiene aproximadamente durante otras 2 horas.

Asimismo, como puede observarse en la Figura 4.1, un incremento de la agitación desde 100 hasta 600 rpm favorece el crecimiento celular; es decir, según se mejoran las condiciones de transporte, las curvas de crecimiento presentan una pendiente más pronunciada y alcanzan una mayor concentración celular. Así, a 100 rpm, la concentración máxima de biomasa es de 1,44 g/L, en un tiempo de crecimiento de 30 h, pasando a 4,93 g/L a las 16 h, para 600 rpm. Sin embargo, a partir de esta última agitación, el crecimiento no se ve afectado por el aumento de la agitación, y los valores de la concentración de biomasa alcanzados son prácticamente los mismos, de unos 5,1 g/L, a las 16 h de crecimiento.

En cuanto a la evolución del oxígeno disuelto durante el cultivo, los valores experimentales mostrados en las Tablas 4.4 a 4.7, se han representado en la Figura 4.2. Como se puede observar en dicha figura, en los experimentos llevados a cabo a velocidades de agitación bajas, se consume el oxígeno disuelto en muy pocos minutos, si bien la disminución de la concentración de oxígeno es más lenta cuanto mayor es la agitación. Así, para agitaciones comprendidas entre 100 y 300 rpm, el oxígeno se mantiene en un valor de prácticamente el 0 % de saturación durante la mayor parte del crecimiento; mientras que para valores de la agitación, entre 400 y 500 rpm, la concentración de oxígeno desciende hasta 0 % de saturación, para, posteriormente, aumentar su valor. La evolución del oxígeno disuelto indica que el crecimiento, en estas condiciones de operación, se está llevando a cabo en todo, o en su mayor parte, en una situación de limitación de oxígeno.

Por el contrario, a velocidades de agitación entre 600 y 2000 rpm, la concentración de oxígeno disminuye hasta alcanzar un valor mínimo (siempre superior al 30 % de saturación), que se alcanza en la mitad de la fase exponencial del crecimiento y, posteriormente, aumenta a medida que los requerimientos energéticos disminuyen y, por tanto, la demanda de oxígeno se reduce. En estas condiciones la evolución del oxígeno disuelto sigue el comportamiento observado anteriormente en este trabajo, en el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 y descrito en cultivos de *X. campestris* (García-Ochoa y col., 2000) y *E. coli* (Çalik y col., 2006), entre otros.

En cuanto al consumo de las fuentes de carbono a lo largo del crecimiento, los resultados experimentales de la concentración de glicerol y de ácido glutámico, mostrados en las Tablas 4.8 a 4.11 han sido también recogidos, para una más fácil interpretación, en las Figuras 4.3 y 4.4. Como puede observarse, en todas las condiciones de operación, ambos nutrientes son consumidos simultáneamente a lo largo del crecimiento, aunque no con la misma velocidad, y que al aumentar la agitación, la velocidad de consumo de ambos nutrientes también se incrementa. Así, a las 30 h del crecimiento y 100 rpm, se han consumido 1,75 g/L de glicerol y 1,99 g/L de ácido glutámico; mientras que a 700 rpm se consume, en las primeras 10 h, todo el glicerol (2 g/L) y al final del crecimiento, en torno a las 16 h, 13,5 g/L de ácido glutámico. Además, a partir de esta agitación un aumento de la agitación no se traduce en un aumento de la velocidad de consumo del sustrato carbonado, observándose una evolución muy similar de los valores experimentales de la concentración de ambos nutrientes en estas condiciones.

Por otro lado, como es bien conocido, la aplicación de la estequiometría requiere conocer diferentes rendimientos. Estos se definen como la relación entre la cantidad de producto obtenido y el sustrato consumido. Con el fin de determinar la cantidad de biomasa que puede producirse por unidad de sustrato consumido, se ha determinado el rendimiento de glicerol y de ácido glutámico, en biomasa, en los distintos cultivos realizados, de acuerdo a la relación:

$$Y_{x/j} = \frac{C_x - C_x^0}{C_j^0 - C_j} \quad j = \text{glicerol, ácido glutámico} \quad [4.1]$$

En las Figuras 4.5 y 4.6 se muestra la evolución con el tiempo del rendimiento de glicerol y de ácido glutámico en biomasa, respectivamente. Como puede observarse

en las citadas figuras, los rendimientos de ambos sustratos en biomasa, muestran dos comportamientos distintos, dependiendo de la agitación a la que se ha llevado a cabo el cultivo. Así, y de acuerdo con el análisis de los resultados del resto de parámetros del cultivo, cuando el crecimiento está limitado por la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio (velocidades de agitación entre 100 y 500 rpm), los rendimientos evolucionan desde su valor máximo, al comienzo del crecimiento, al valor más pequeño a final del mismo. Por el contrario, cuando el cultivo no se encuentra limitado por la disponibilidad de oxígeno disuelto (velocidades de agitación entre 600 y 2000 rpm), los rendimientos presentan valores muy similares, alcanzando un valor máximo a las 5 h.

Otro aspecto importante del crecimiento es la evolución del pH, ya que las enzimas que controlan el metabolismo microbiano pueden verse afectadas por la acidez del medio (Nielsen y col., 2003). En la mayoría de los bioprocesos, el pH puede variar sustancialmente a lo largo del crecimiento, y su variación depende, principalmente, de la naturaleza de la fuente de nitrógeno utilizada en el medio de cultivo. Los datos experimentales de la evolución del pH mostrado en la Tabla 4.12 se han representado en la Figura 4.7. Como se puede observar, el pH a lo largo del crecimiento, para todas las condiciones estudiadas, aumenta desde valores ligeramente ácidos hasta valores claramente básicos (que se corresponde con la disminución de ácido glutámico en el medio). Asimismo, como puede observarse en la Figura 4.7, de nuevo se pueden distinguir dos tendencias distintas, dependiendo de la velocidad de agitación. En un primer grupo de experimentos, que comprende el intervalo de agitaciones entre 100 y 500 rpm, el pH aumenta de forma prácticamente lineal desde el inicio del crecimiento hasta un momento determinado, a partir del cual, cambia ligeramente su pendiente. En cuanto al segundo grupo de experimentos, que comprende agitaciones entre 600 y 2000 rpm, los valores de pH muestran una evolución similar al del crecimiento; es decir, un ligero aumento del pH durante fase de latencia, seguida de un incremento exponencial y una última fase en la que la velocidad de cambio del pH es menor.

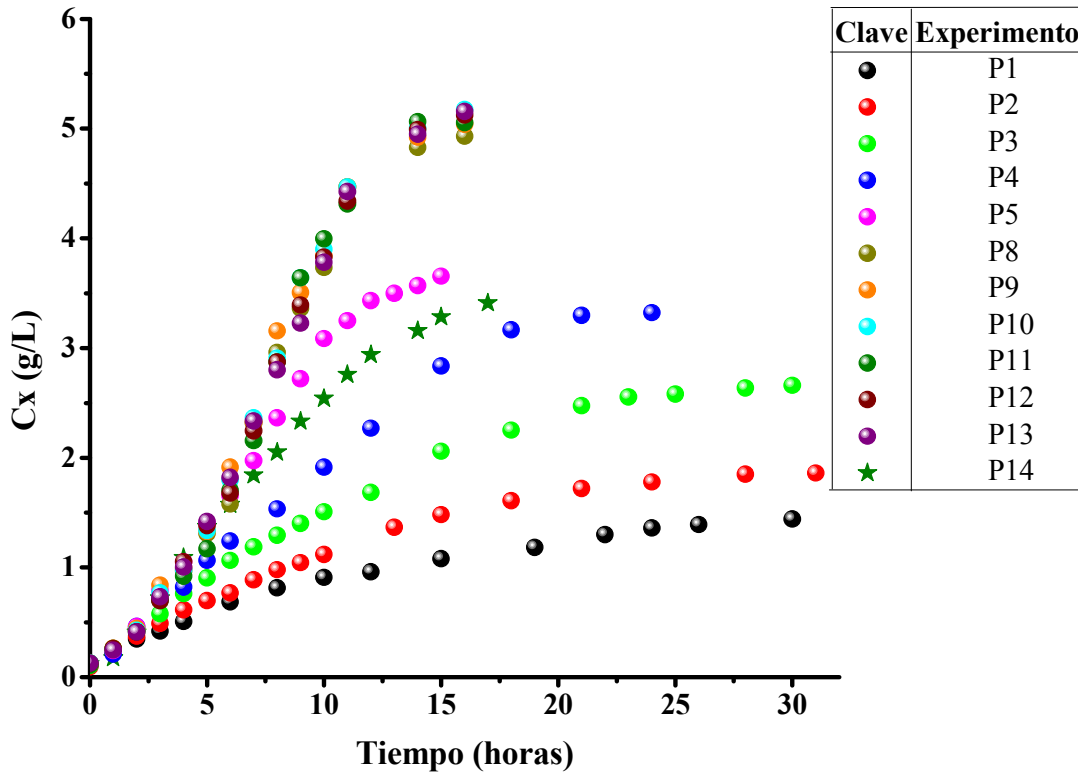


Figura 4.1 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *P. putida* KTH2 bajo distintas velocidades de agitación del cultivo.

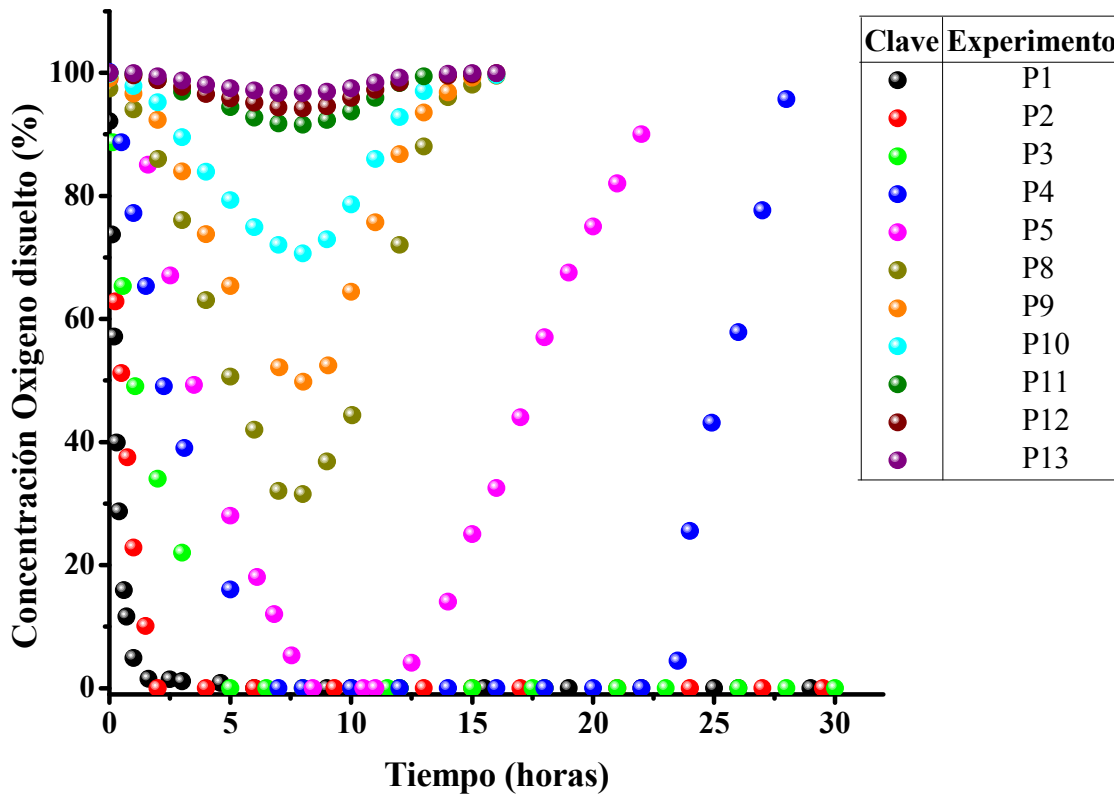


Figura 4.2 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

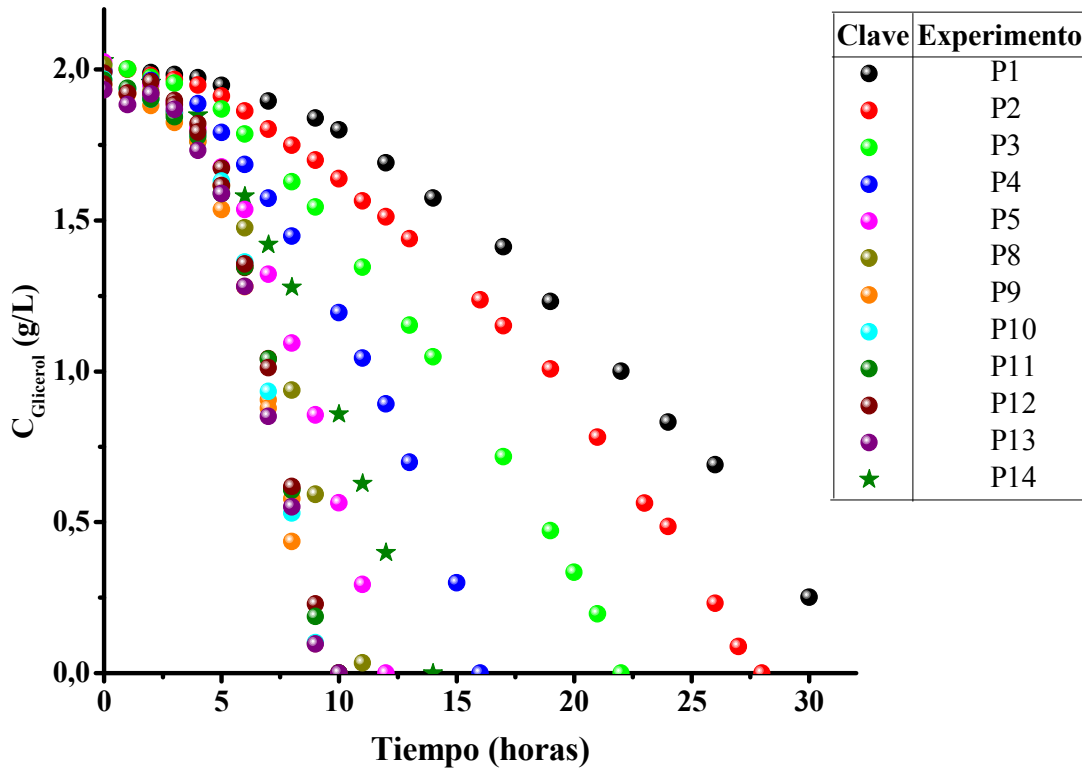


Figura 4.3 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

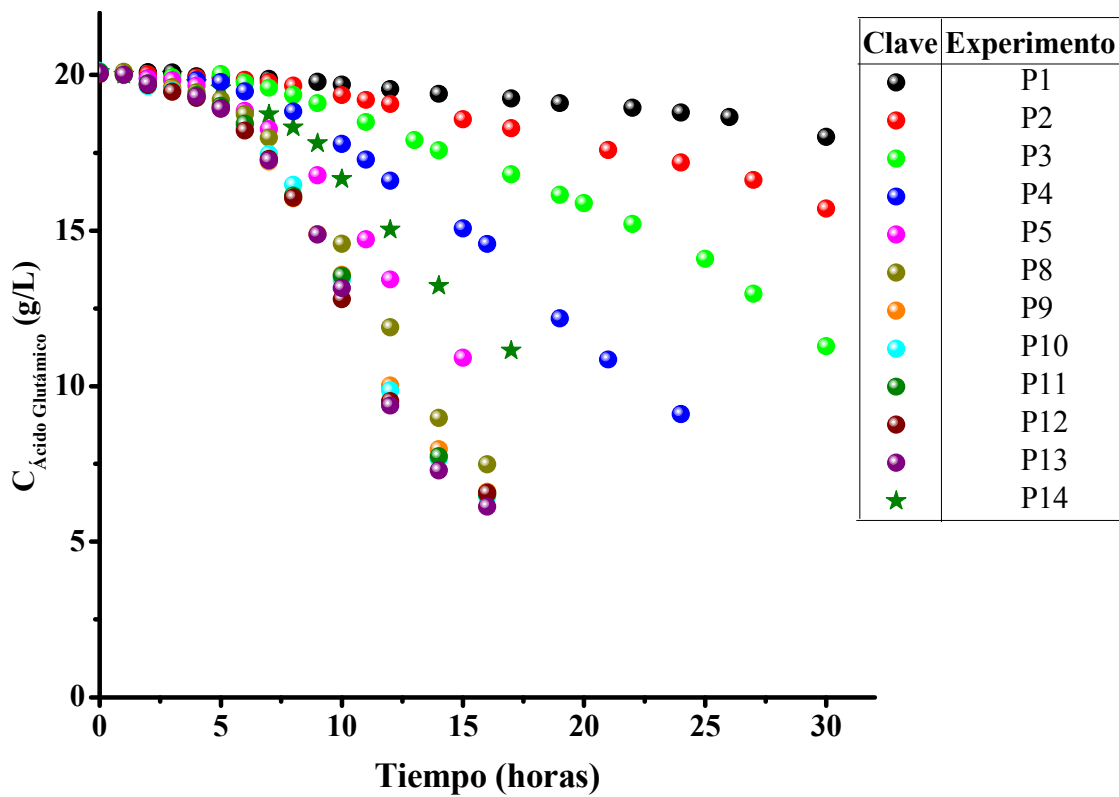


Figura 4.4 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

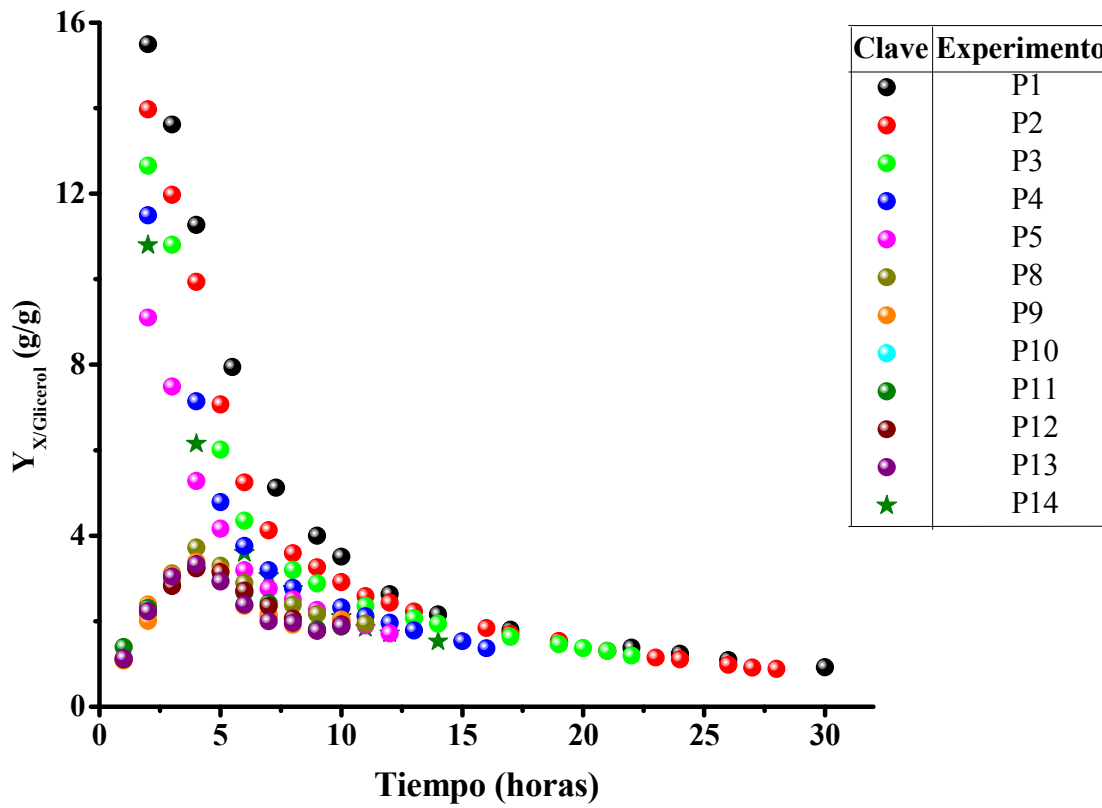


Figura 4.5 - Evolución del rendimiento de glicerol en biomasa durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

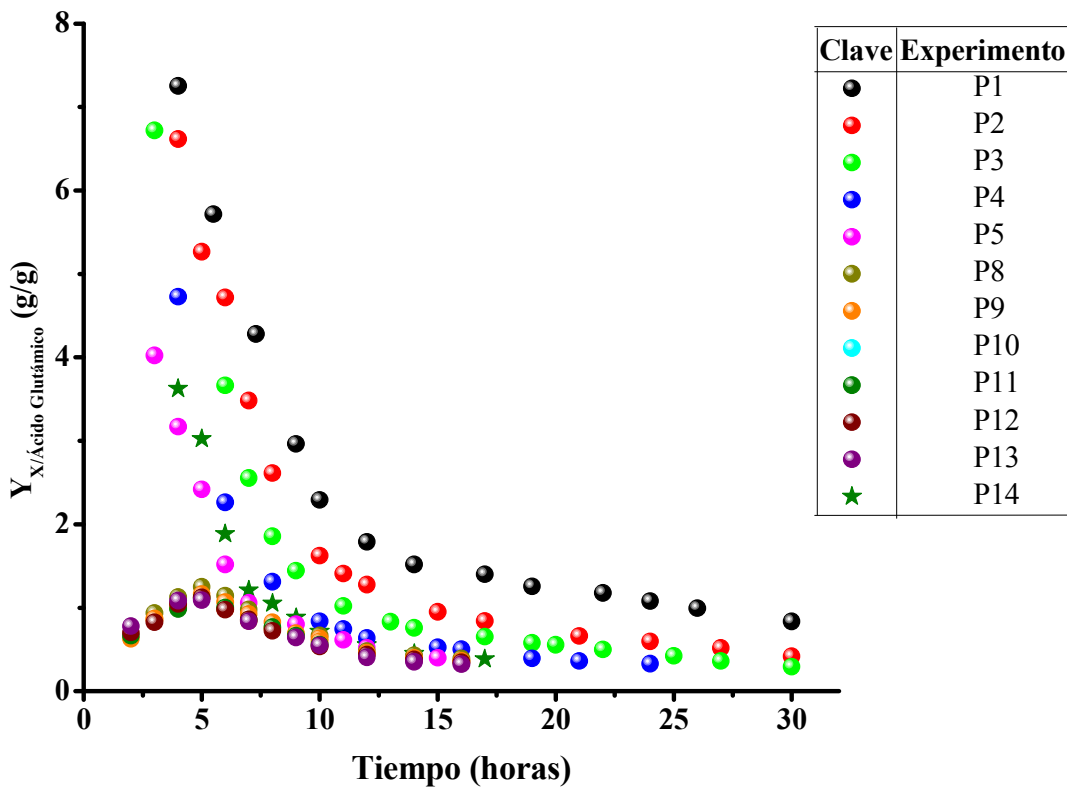


Figura 4.6 - Evolución del rendimiento de ácido glutámico en biomasa durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

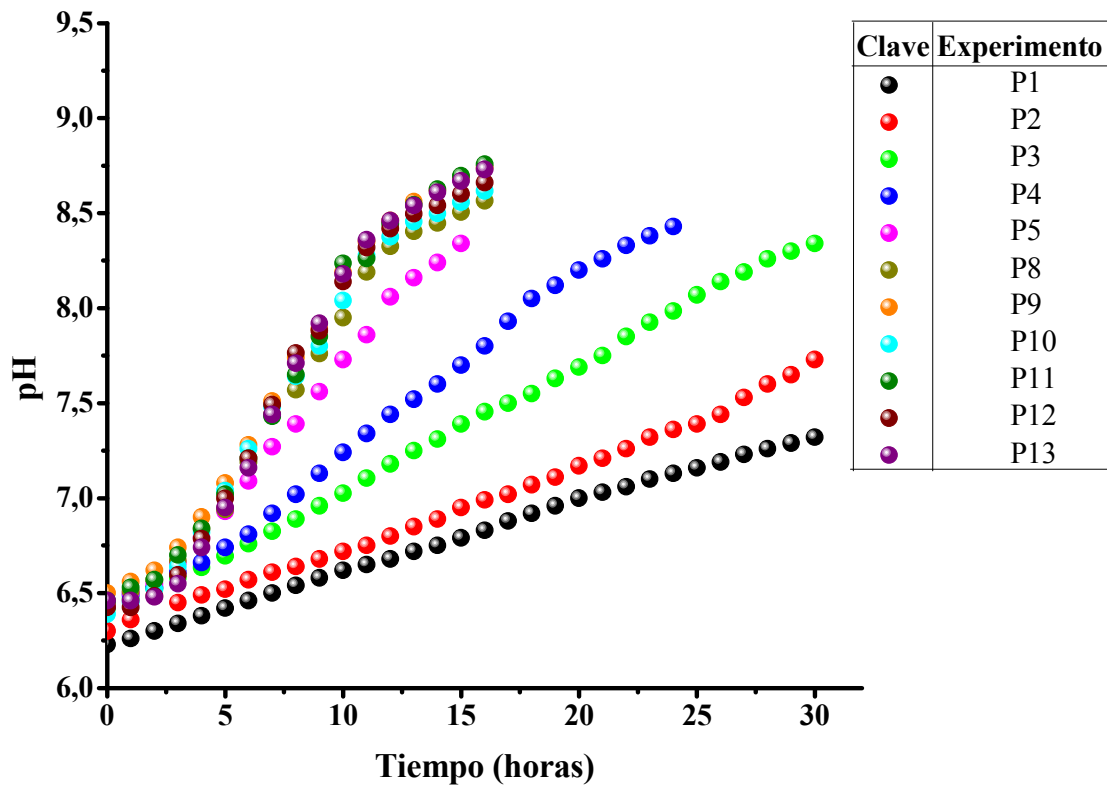


Figura 4.7 - Evolución del pH durante el cultivo de *P. putida* KTH2 con la velocidad de agitación.

4.1.2. Modelo cinético del crecimiento

Cuando se cultivan microorganismos en un medio apropiado, las células comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que les aporta el medio de cultivo para "fabricar" nuevas células. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio se agota y el crecimiento se detiene. Por tanto, hay dos aspectos claramente diferenciables que caracterizan al crecimiento microbiano, ya que éste puede expresarse como una reacción química: uno estequiométrico, por el cual la concentración final de microorganismos obtenidos, C_X^{max} , dependerá de la composición del medio de cultivo, de su concentración o disponibilidad, y el otro cinético, el que describirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso en las condiciones de operación establecidas.

Como se indicó en el capítulo anterior, el estudio cinético puede servir para entender cómo se produce el crecimiento celular y conocer cómo influyen las condiciones de operación sobre el mismo. Así, el modelo matemático de crecimiento y el análisis de la evolución de los parámetros cinéticos, en las diferentes condiciones,

permitirá proponer unas condiciones óptimas para el cultivo y/o establecer las restricciones hidrodinámicas del crecimiento.

Teniendo en cuenta que la ecuación logística (Ec. [3.13]), resultó un modelo adecuado para la descripción de la cinética del crecimiento de *R. erythropolis*, esta ecuación se ha empleado, en una primera aproximación, para la modelización del crecimiento de *P. putida* KTH2. Así, para la determinación de los parámetros cinéticos, se han ajustado a la citada ecuación los valores experimentales de concentración de biomasa (C_x) y tiempo (t), fijando el valor de C_x^0 en su valor inicial, medido experimentalmente. En la Tabla 4.13 se muestran los valores óptimos de los parámetros cinéticos (μ y C_x^{max}) y de los parámetros estadísticos (error del parámetro estimado, la suma de los residuos al cuadrado, SRC, F de Fischer y el intervalo de confianza), obtenidos de los diferentes ajustes. Como puede observarse, los valores de la F de Fischer, en todos los casos, son mucho mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95 %; además, se puede apreciar que la suma de los residuos al cuadrado, SRC, es muy baja, lo cual indica que el ajuste de los datos experimentales a la función es, en principio, bueno.

Después del proceso de optimización del modelo, es indispensable proceder a su validación y la evaluación crítica del mismo. Ésta se ha llevado a cabo mediante las correspondientes simulaciones de los experimentos realizados. En la Figura 4.8 se representan los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la predicción proporcionada por la ecuación logística. En dicha figura se pone de manifiesto que, para velocidades de agitación bajas -de 100 a 500 rpm-, el crecimiento que simula el modelo cinético no se ajusta del todo bien a la evolución real del mismo. Así, el modelo describe una fase de latencia inicial que las curvas de crecimiento, en estas condiciones, no presentan. Sin embargo, para los crecimientos realizados a velocidades de agitación altas -de 600 a 2000 rpm-, el modelo cinético representa correctamente el comportamiento general del mismo, mostrando sólo pequeñas diferencias entre los valores simulados y los experimentales. Este hecho pone de manifiesto que la ecuación logística tiene limitaciones a la hora de describir el crecimiento de los cultivos de *P. putida* KTH2 y, aunque estadísticamente el modelo puede ser válido, éste no es capaz de describir de forma adecuada la evolución de este sistema en todas las condiciones de operación estudiadas.

Esta doble conducta del crecimiento de *P. putida* KTH2, según se cultiven las células en unas condiciones u otras, se ha puesto de manifiesto en la Figura 4.9, donde se ha representado la velocidad de crecimiento, $r_x = dCx/dt$ frente al tiempo de cultivo. En dicha figura, se distinguen dos evoluciones de la velocidad de crecimiento; por un lado, para velocidades de agitación entre 100 y 500 rpm (condiciones de cultivo con limitación de oxígeno, ver Figura 4.2), se observa que r_x disminuye con el tiempo. Por el contrario, para velocidades de agitación entre 600 y 2000 rpm (sin limitaciones por transporte de oxígeno), r_x aumenta hasta alcanzar un máximo, aproximadamente a la mitad del tiempo de crecimiento, para luego disminuir conforme avanza el tiempo de cultivo. Este escenario, consecuencia de la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es el que puede ser descrito de forma adecuada mediante un modelo representado por la ecuación logística.

Los resultados anteriormente descritos se han puesto de manifiesto a través del factor de efectividad para el crecimiento, η . Como se indicó en el Capítulo 3 de la presente Memoria, este factor se ha definido como la relación entre la velocidad específica de crecimiento observada, μ , y la velocidad específica máxima o formal del crecimiento, μ^* ; es decir, la que se tendría en ausencia de limitaciones de mezcla, de transferencia de materia o de efectos hidrodinámicos.

En la Figura 4.10 se muestra la influencia de la velocidad de agitación en el factor de efectividad para el crecimiento, η , y en la concentración de biomasa máxima alcanzada, C_x^{max} , de acuerdo a un crecimiento descrito por la ecuación logística. Como puede observarse, la evolución de η que predice la aplicación del modelo es anómala, ya que al aumentar la agitación desde 100 hasta 500 rpm, los valores de η no aumentan. Este hecho es consecuencia de la escasa reproducibilidad del modelo en estas condiciones, ya que como se puede observar en la Figura 4.1, al aumentar la velocidad de agitación, en ese intervalo, el crecimiento celular se ve favorecido, con un incremento de la velocidad. Además, aunque el modelo predice un aumento de C_x^{max} con la agitación, los valores proporcionados, en este intervalo de agitaciones, son sensiblemente menores que los experimentales. Sin embargo, para valores superiores a 500 rpm, la ecuación logística simula, de forma adecuada, la evolución de ambos parámetros, observándose que se alcanza una “plataforma” (zona b), en la que el valor

de η y la C_x^{max} no varían significativamente con el incremento de la velocidad de agitación.

Por tanto, del proceso de validación del modelo, se puede concluir que la ecuación logística, en este caso, no es una buena representación matemática del crecimiento. Este hecho lleva a la necesidad de reformular las hipótesis que conforman el modelo y plantear otra ecuación diferencial que represente las relaciones cuantitativas del crecimiento, capaz de describirlo en toda su amplitud y condiciones.

Tabla 4.13 - Valores de los parámetros calculados, proporcionados por el ajuste de la ecuación logística.

Exp.	C_x^0 (g/L)	μ (h ⁻¹)	Δ	C_x^{max} (g/L)	Δ	SRC	F de Fisher	
							Obtenido	Tabulado (95 %)
P1	0,11	0,410	± 0,038	1,229	± 0,063	0,020	336	2,732
P2	0,10	0,437	± 0,029	1,627	± 0,087	0,030	419	2,811
P3	0,11	0,418	± 0,024	2,360	± 0,119	0,041	670	2,663
P4	0,12	0,439	± 0,031	2,983	± 0,195	0,051	536	2,811
P5	0,12	0,550	± 0,018	3,484	± 0,118	0,018	2602	2,568
P8	0,13	0,515	± 0,013	4,878	± 0,181	0,016	3512	2,464
P9	0,12	0,520	± 0,013	4,916	± 0,173	0,015	3922	2,442
P10	0,13	0,509	± 0,010	5,065	± 0,156	0,011	5329	2,442
P11	0,13	0,493	± 0,009	5,137	± 0,144	0,009	6676	2,441
P12	0,12	0,500	± 0,011	5,013	± 0,174	0,014	4277	2,464
P13	0,13	0,517	± 0,014	4,917	± 0,206	0,012	3831	2,464
P14	0,12	0,528	± 0,022	3,062	± 0,121	0,021	1729	2,421

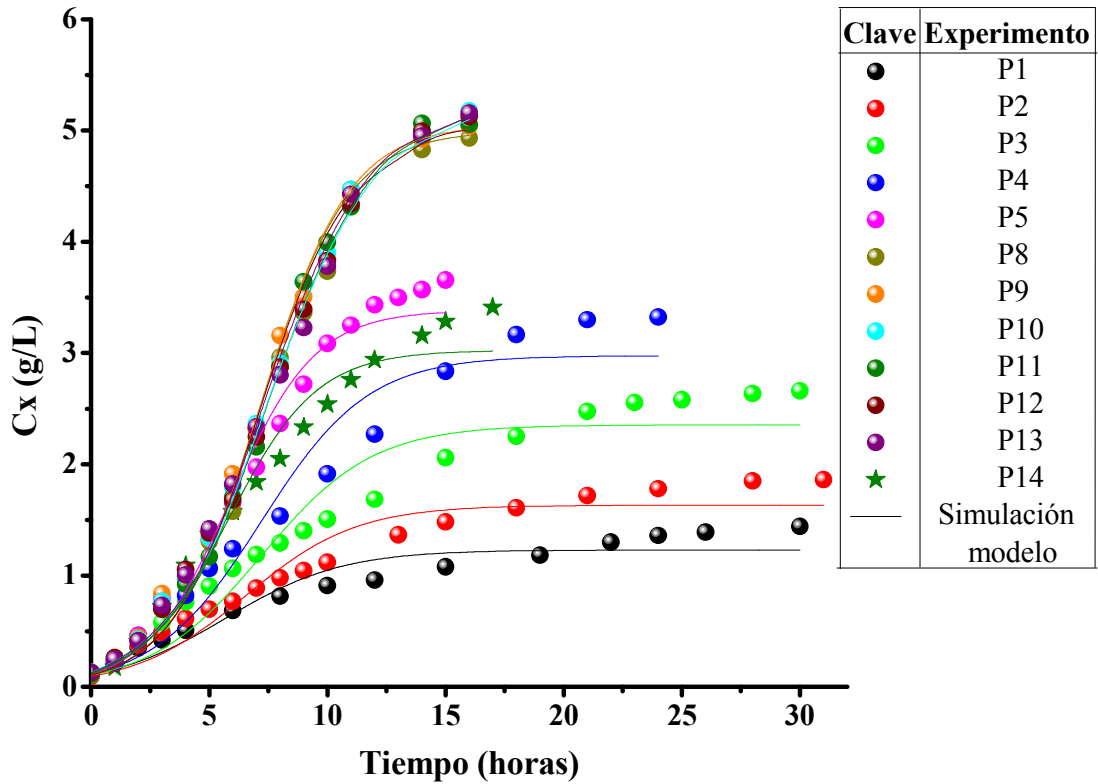


Figura 4.8 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la ecuación logística (—) del cultivo de *P. putida* KTH2 bajo distintas velocidades de agitación.

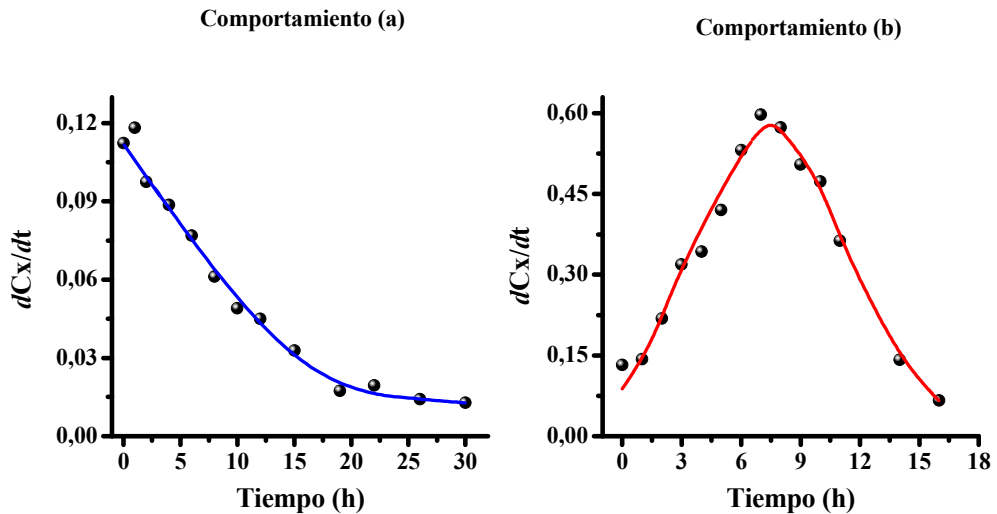
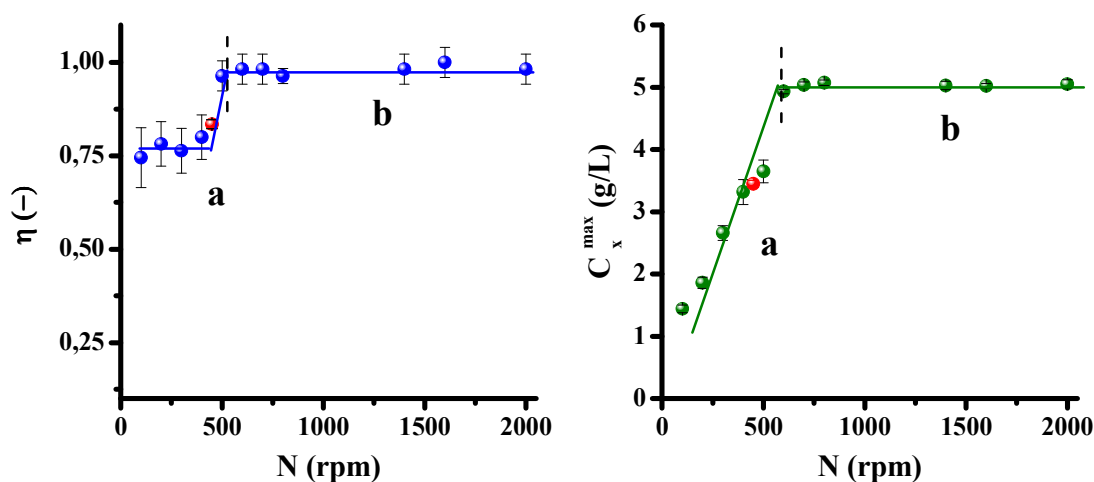


Figura 4.9 - Diferencias de comportamiento de la evolución de la velocidad de crecimiento (r_x) de *P. putida* KTH2. (a): agitaciones bajas (100 a 500 rpm) y (b): agitaciones altas (600 a 2000 rpm).



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.10 - Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , y la concentración de biomasa máxima, C_X^{\max} , en cultivos de *P. putida* KTH2 (●, ●) Experimentos P1 a P5 y P8 a P13 y (●) Experimento P14.

- **Modelo cinético dependiente del oxígeno**

El análisis anterior parece indicar que el crecimiento *P. putida* KTH2 está modulado por la concentración de oxígeno disuelto. Este hecho ha quedado patente cuando el cultivo se lleva a cabo a agitaciones bajas. Por tanto, en un segundo intento, se ha planteado la utilización de una ecuación de Monod, que describa el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante, la concentración de oxígeno, de acuerdo a la expresión:

$$\frac{dCx}{dt} = \frac{\mu \cdot C_{O_2}}{K_s + C_{O_2}} \quad [4.2]$$

donde K_s es la constante de saturación del modelo de Monod debido al sustrato limitante, que proporciona la afinidad que tiene el microorganismo por el sustrato en cuestión (a menor K_s mayor afinidad).

Para la determinación de los parámetros del modelo cinético (μ y K_s), se ha ajustado la Ec. [4.2] a los valores experimentales de concentración de biomasa, de oxígeno disuelto y de tiempo. Para el experimento, en el que se han cultivado las células en incubadora orbital (P14), no se ha llevado a cabo la modelización debido a que no se

disponen de datos experimentales de la evolución del oxígeno disuelto durante el crecimiento.

En la Tabla 4.14 se muestran los valores óptimos del parámetro del modelo cinético y los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones realizadas. Como puede observarse, aunque estadísticamente el modelo puede ser válido (con valores obtenidos de la F de Fischer, en todos los casos, mucho mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95%), la reproducción de los valores experimentales de la biomasa, para el caso de los experimentos que se han realizado a velocidades de agitación altas -de 600 a 2000 rpm-, no son buenos, ya que el modelo no es capaz de simular la fase de latencia del crecimiento (Figura 4.11). Sin embargo, para los experimentos realizados a velocidades de agitación bajas -de 100 a 500 rpm- la Ec. [4.2] reproduce satisfactoriamente la evolución del cultivo.

De manera análoga, y como se realizó con el modelo anterior, se ha determinado la influencia de la agitación en el factor de efectividad para el crecimiento, η , obtenido a partir de este modelo. Como se puede observar en la Figura 4.12 la evolución de η con la agitación muestra distintas tendencias, dependiendo de la velocidad de agitación.

Por tanto, la ecuación de Monod dependiente del oxígeno no proporciona una buena representación de los datos experimentales del crecimiento para todas las condiciones de agitación. Por esta razón es necesario plantear otro modelo matemático, que permita mejorar las deficiencias mostradas en los anteriores y reproduzca adecuadamente la evolución de la biomasa a lo largo del tiempo, tanto en condiciones limitante de oxígeno, como no limitantes.

Tabla 4.14 - Valores de la velocidad específica de crecimiento, μ , proporcionada por el ajuste del modelo cinético dependiente de oxígeno.

Exp.	μ $\left(\frac{g}{L \cdot h}\right)$	Δ	$K_s \cdot 10^6$ (g/L)	Δ $\cdot 10^7$	SRC	F de Fisher	
						Obtenido	Tabulado (95 %)
P1	0,085	± 0,004	1,441	± 0,430	0,008	2060	2,923
P2	0,113	± 0,002	1,136	± 0,961	0,006	11276	3,016
P3	0,156	± 0,002	0,752	± 0,458	0,006	21271	2,862
P4	0,199	± 0,003	0,348	± 0,584	0,007	8711	3,016
P5	0,228	± 0,003	0,580	± 0,646	0,007	7644	2,767
P8	0,331	± 0,019	1,078	± 6,071	0,019	417	2,674
P9	0,339	± 0,019	1,140	± 5,631	0,022	378	2,652
P10	0,345	± 0,018	1,251	± 6,214	0,024	391	2,652
P11	0,342	± 0,017	1,183	± 5,569	0,021	406	2,652
P12	0,341	± 0,017	1,047	± 5,941	0,020	411	2,674
P13	0,346	± 0,018	1,112	± 5,762	0,019	414	2,674

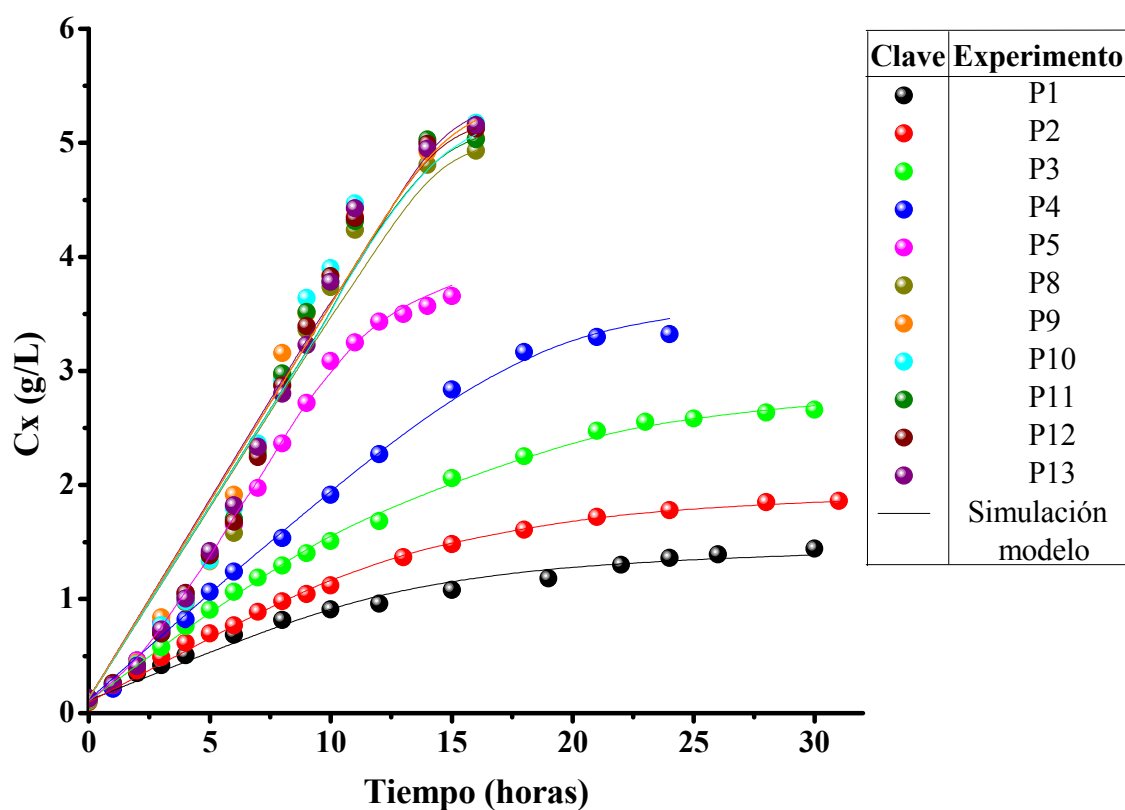
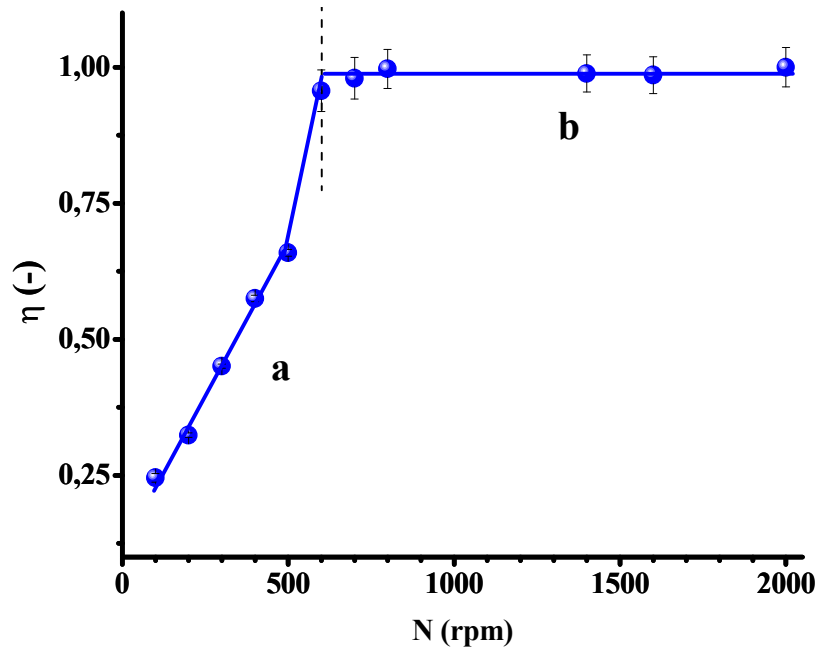


Figura 4.11 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la Ec. [4.2] (—) del cultivo de *P. putida* KTH2 bajo distintas velocidades de agitación.



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.12 - Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , en cultivos de *P. putida* KTH2. Experimentos P1 a P5 y P8 a P13.

- **Modelo cinético compuesto**

A raíz de los resultados obtenidos en la modelización del crecimiento empleando la ecuación logística (Ec. [3.13]) y la ecuación de Monod dependiente de oxígeno (Ec. [4.2]), en este apartado se plantea representar el cambio de la concentración de biomasa con respecto del tiempo en función de la cantidad de sustrato (oxígeno) a consumir y de la cantidad de biomasa presente. Así, tomando en cuenta estas hipótesis y aplicando el principio de superposición de causas y efectos, puede escribirse la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu \cdot C_{O_2}}{K_1 + C_{O_2}} \cdot \frac{C_x}{K_2 \cdot C_{O_2} + C_x} \quad [4.3]$$

donde K_1 y K_2 son sendas constantes de saturación de Monod.

La ecuación diferencial [4.3] representa el modelo matemático de crecimiento microbiano que describe la variación de la biomasa con el tiempo de acuerdo a una expresión de tipo Monod compuesta.

Para la determinación de los parámetros cinéticos del modelo, se ha ajustado la ecuación [4.3] a los datos experimentales de concentración de biomasa, oxígeno disuelto y tiempo. Debido a que las constantes K_1 y K_2 varían dependiendo de las condiciones de operación, en los ajustes, se han fijado en un valor medio de $1,12 \cdot 10^{-6}$ y $41,5$ (g/L), respectivamente. En la Tabla 4.15 se muestran los valores del parámetro μ para los experimentos P1 a P5 y P8 a P13. En la misma tabla también se recogen, como en los casos anteriores, los parámetros estadísticos. Como puede observarse los valores de la F de Fischer, en todos los casos, son mucho mayores que los tabulados para un nivel de confianza del 95 %; además, se puede apreciar que la suma de los residuos al cuadrado, SRC, es muy baja, lo cual indica que la reproducción de los datos experimentales es buena.

Después del proceso de optimización de parámetros, se han llevado a cabo las correspondientes simulaciones de los datos experimentales y proceder a la evaluación crítica del modelo. En la Figura 4.13 se muestran dichos datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la predicción proporcionada por el modelo cinético. Como se puede observar, en todas las condiciones de agitación, el modelo simula satisfactoriamente la evolución de la biomasa con el tiempo.

Los buenos resultados obtenidos en la simulación del crecimiento con la Ec. [4.3] quedan reflejados en la evolución del factor de efectividad para el crecimiento con la agitación (Figura 4.14). La tendencia que sigue η con N ponen de manifiesto la influencia que tiene la hidrodinámica establecida en el biorreactor sobre el crecimiento de *P. putida* KTH2: desde 100 hasta 600 rpm (zona a), los valores de η aumentan, y, a partir de 600 rpm, prácticamente su valor es constante (zona b).

Por otro lado, a la vista de los resultados mostrados en las Figuras 4.13 y 4.14, es importante resaltar que las condiciones fluidodinámicas y de transporte de oxígeno que se establecen en incubadora orbital, a 210 rpm, para el cultivo de *P. putida* KTH2 (experimento P14), se corresponden con las del biorreactor trabajando entre 400 y 500 rpm, con crecimientos análogos en una situación limitante de oxígeno.

Por otra parte, en el caso de *P. putida* KTH2, no se detecta la disminución de la velocidad de crecimiento y de la concentración máxima de biomasa, como sucedía en el caso de *R. erythropolis*; es decir, no se aprecia estrés hidrodinámico u oxidativo a ninguna de las condiciones hidrodinámicas estudiadas.

Tabla 4.15 - Valores de la velocidad específica de crecimiento, μ , proporcionada por el ajuste del modelo cinético compuesto.

Exp.	μ (h ⁻¹)	Δ	SRC	F de Fisher	
				Obtenido	Tabulado (95%)
P1	0,085	± 0,004	0,001	2465	0,083
P2	0,121	± 0,003	0,001	5334	0,117
P3	0,185	± 0,002	0,002	14523	0,189
P4	0,237	± 0,003	0,002	4923	0,232
P5	0,355	± 0,002	0,004	14856	0,357
P8	0,423	± 0,010	0,004	1631	0,402
P9	0,445	± 0,009	0,004	2157	0,434
P10	0,444	± 0,010	0,004	1520	0,422
P11	0,443	± 0,012	0,004	1087	0,416
P12	0,440	± 0,011	0,004	1416	0,416
P13	0,437	± 0,018	0,004	2114	0,422

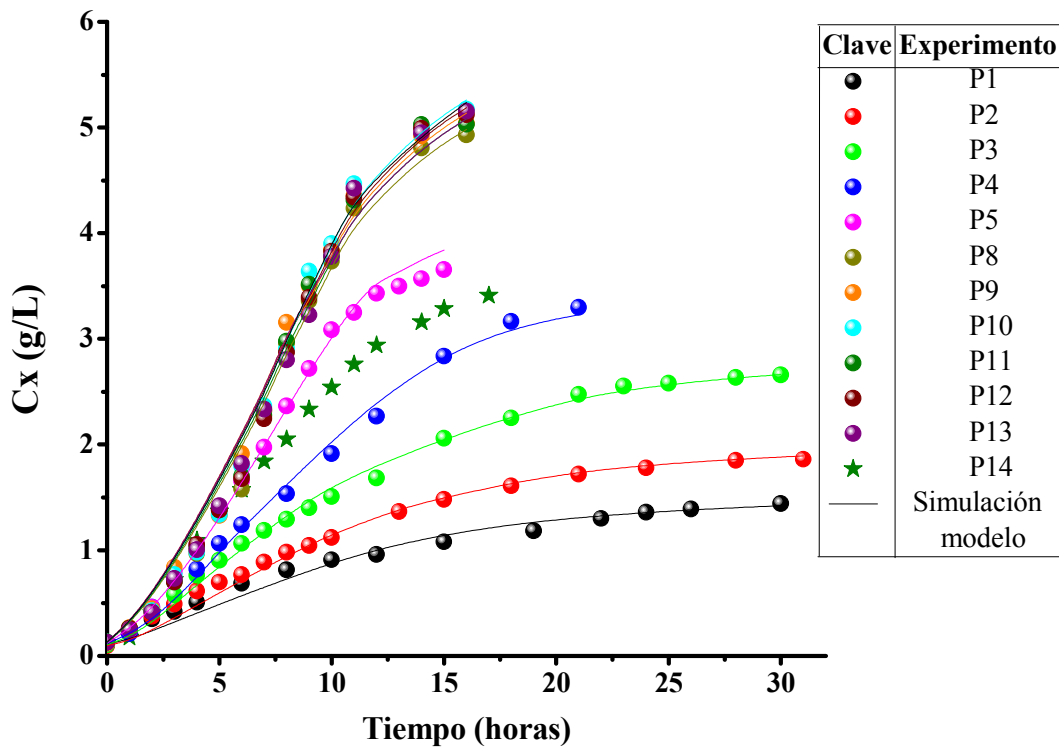
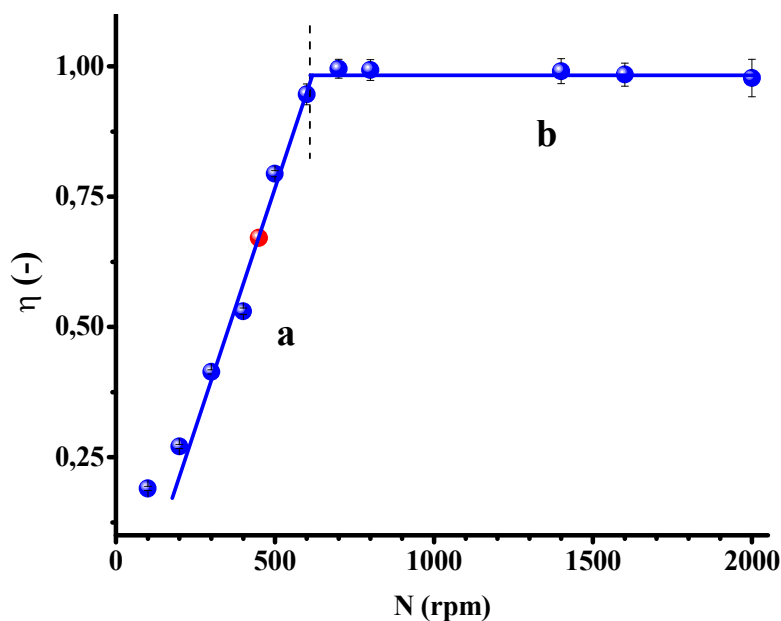


Figura 4.13 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la Ec. [4.3] (—) del cultivo de *P. putida* KTH2 bajo distintas velocidades de agitación.



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.14 - Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , en cultivos de *P. putida* KTH2. (●) Experimentos P1 a P5 y P8 a P13 y (●) experimento P14.

4.1.3. Análisis de la velocidad de consumo de oxígeno

Como se ha podido comprobar en el apartado anterior (Capítulo 3 de esta Memoria), tanto la OTR (y por tanto, el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno) como la OUR tienen una importancia decisiva en la evolución del cultivo, debido a que el transporte de oxígeno es la etapa controlante del proceso de crecimiento, al menos para agitaciones inferiores a 600 rpm. Por tanto, teniendo en cuenta que durante el proceso se dan diferentes situaciones de crecimiento, dependiendo de las velocidades de transporte y de consumo de oxígeno, se hace necesario un estudio profundo e individualizado de ambos fenómenos durante el cultivo de *P. putida* KTH2.

Debe señalarse que en este trabajo fueron realizadas, en un primer intento, medidas de OUR empleando el método dinámico clásico. Sin embargo, debido a las características de los cultivos de *P. putida* KTH2, con una elevada velocidad de

consumo de oxígeno, como se pone de manifiesto en la Figura 4.2, sólo fue posible aplicar este método experimental de medida durante la etapa de latencia (si bien los valores de experimentales mostraban una gran dispersión). En consecuencia, en este caso se ha analizado la velocidad de consumo de oxígeno utilizando la técnica desarrollada en un trabajo anterior (Santos y col., 2006) y descrita en el Apartado 2.3.1.6 de la presente Memoria. Este método consiste en la determinación de la velocidad de consumo a partir del cambio de la concentración de oxígeno disuelto $\left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_p$ y de la velocidad de transporte de oxígeno (OTR), de acuerdo a la Ec. [4.4].

$$OUR_p = q_{O_2} \cdot C_x = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) - \left(\frac{dCO_2}{dt}\right)_p \quad [4.4]$$

Para la aplicación de este método es necesario conocer OTR. En este caso, debido a las mismas dificultades de medida antes señaladas, se ha realizado una estimación de $k_L a$. De esta manera, al igual que se llevo a cabo con la bacteria *R. erythropolis* IGTS8 en el Apartado 3.2 de la presente Memoria, para la estimación de $k_L a$ se ha seguido el procedimiento detallado en el Apartado 2.4.1 del Capítulo de Materiales y Métodos.

En las Tablas 4.16 a la 4.18 se presentan los resultados obtenidos de la evolución de $k_L a$ y de OUR a lo largo del crecimiento, para las distintas velocidades de agitación y un caudal de aireación constante de 2 L/min.

Tabla 4.16 - Datos experimentales de *OUR* en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo para los experimentos P1 a P4.

Experimento P1			Experimento P2			Experimento P3			Experimento P4		
C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^4$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^7$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^3$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^6$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^6$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^6$ (mol/L · s)
0,14	8,347	0,072	0,12	5,376	0,392	0,12	1,568	0,393	0,17	3,292	0,903
0,16	8,229	1,265	0,16	5,229	0,591	0,19	1,510	1,251	0,27	3,181	1,761
0,17	8,173	1,496	0,19	5,120	0,756	0,28	1,465	1,811	0,38	3,108	2,631
0,19	8,030	1,721	0,23	5,033	0,913	0,43	1,413	2,272	0,53	3,035	3,786
0,24	7,792	1,844	0,29	4,907	1,068	0,58	1,378	2,626	0,70	2,975	4,448
0,31	7,534	1,828	0,37	4,786	1,162	0,91	1,326	3,243	1,06	2,888	5,943
0,35	7,418	1,794	0,49	4,649	1,146	1,29	1,288	3,163	1,47	2,822	6,914
0,46	7,134	1,732	0,61	4,542	1,113	1,68	1,260	3,091	1,60	2,805	6,875
0,69	6,766	1,655	0,70	4,482	1,106	2,06	1,238	3,037	1,93	2,768	6,782
0,91	6,512	1,607	0,98	4,329	1,068	2,48	1,220	2,993	2,24	2,739	6,711
0,96	6,466	1,581	1,25	4,222	1,030	2,55	1,216	2,983	2,52	2,715	6,655
1,08	6,364	1,567	1,37	4,183	1,024	2,58	1,215	2,981	2,79	2,696	6,616
1,18	6,286	1,542	1,48	4,149	1,026	2,64	1,213	2,977	3,17	2,672	6,556
1,30	6,206	1,527	1,61	4,114	1,018	2,66	1,212	2,978	3,30	2,664	6,532
1,36	6,169	1,512	1,72	4,086	1,002				3,42	2,658	4,866
1,44	6,120	1,501	1,86	4,071	0,995						

Tabla 4.17 - Datos experimentales de *OUR* en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo para los experimentos P5 a P10.

Experimento P5			Experimento P8			Experimento P9			Experimento P10		
C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^5$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^5$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^5$ (mol/L · s)	C_x (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s^{-1})	$OUR \cdot 10^5$ (mol/L · s)
0,43	5,631	0,211	0,26	9,460	0,145	0,27	1,428	0,121	0,25	2,301	0,129
0,56	5,539	0,455	0,43	9,214	0,324	0,44	1,396	0,265	0,43	2,274	0,277
0,79	5,426	0,622	0,73	8,964	0,531	0,74	1,364	0,543	0,77	2,244	0,586
1,40	5,243	0,926	0,91	8,861	0,806	0,96	1,348	0,873	0,98	2,231	0,883
1,70	5,182	1,043	1,31	8,697	1,053	1,33	1,328	1,135	1,34	2,215	1,126
1,92	5,145	1,115	1,69	8,584	1,226	2,46	1,292	1,526	1,80	2,200	1,357
2,14	5,112	1,193	2,31	8,443	1,413	3,16	1,280	1,571	2,36	2,186	1,502
2,28	5,092	1,223	2,96	8,376	1,407	3,51	1,272	1,488	2,91	2,176	1,573
2,41	5,075	1,242	3,36	8,281	1,283	3,84	1,266	1,114	3,64	2,165	1,445
2,88	5,037	1,236	3,74	8,236	1,121	4,47	1,258	0,756	3,90	2,161	1,136
3,02	5,007	1,233	4,51	8,156	0,563	4,66	1,255	0,416	4,47	2,155	0,745
3,26	4,984	1,206	4,63	8,144	0,245	4,87	1,253	0,203	4,71	2,152	0,382
3,57	4,957	1,053	4,83	8,127	0,083	4,92	1,252	0,101	4,87	2,150	0,168
3,65	4,950	0,913	4,88	8,122	0,042	4,99	1,252	0,027	5,16	2,147	0,023
			4,93	8,118	0,012						

Tabla 4.18 - Datos experimentales de *OUR* en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo para los experimentos P11 a P13.

Experimento P11			Experimento P12			Experimento P13		
Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s ⁻¹)	<i>OUR</i> · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a$ (s ⁻¹)	<i>OUR</i> · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a$ (s ⁻¹)	<i>OUR</i> · 10 ⁵ (mol/L · s)
0,26	7,513	0,041	0,26	1,082	0,124	0,25	1,945	0,051
0,41	7,499	0,223	0,41	1,081	0,336	0,41	1,943	0,294
0,70	7,482	0,576	0,70	1,080	0,617	0,73	1,941	0,625
1,17	7,466	1,022	0,98	1,079	0,931	0,99	1,940	0,952
1,70	7,454	1,334	1,26	1,078	1,114	1,32	1,939	1,196
2,16	7,447	1,515	1,68	1,078	1,295	1,82	1,938	1,383
2,87	7,438	1,552	2,25	1,077	1,505	2,33	1,937	1,576
3,64	7,431	1,405	2,87	1,076	1,534	2,80	1,936	1,592
4,00	7,428	1,156	3,39	1,076	1,441	3,23	1,935	1,475
4,37	7,425	0,752	3,83	1,076	1,087	3,78	1,935	1,191
4,83	7,422	0,311	4,34	1,075	0,748	4,43	1,934	0,768
4,97	7,421	0,116	4,64	1,075	0,436	4,73	1,934	0,385
5,11	7,421	0,046	4,99	1,075	0,134	4,95	1,932	0,093
			5,07	1,075	0,082	5,08	1,932	0,057
			5,12	1,075	0,034	5,16	1,932	0,052

4.1.3.1. **Discusión de los resultados**

Para una observación más clara de la variación de OUR con la velocidad de agitación a la que se ha realizado el cultivo, los resultados recogidos en las Tablas 4.16 a 4.18 se muestran en la Figura 4.15. Como se puede observar en dicha figura, dependiendo de la agitación, la evolución de OUR es distinta, presentando dos comportamientos, que se corresponden con los observados en el crecimiento. Así, para velocidades de agitación en las que el crecimiento está limitado por el transporte de oxígeno (entre 100 y 500 rpm), OUR aumenta desde el inicio del crecimiento hasta un tiempo de cultivo determinado a partir del cual $OUR=OTR$, tomando un valor prácticamente constante. En cuanto al segundo grupo de experimentos, en los que el oxígeno no es limitante (de 600 a 2000 rpm), OUR presenta un incremento importante desde el inicio del crecimiento y hasta la mitad de la fase exponencial (en torno a las 8 h de crecimiento), donde alcanza su máximo valor. Además, a pesar de que OTR aumenta con la velocidad de agitación, OUR es prácticamente el mismo. Bajo estas condiciones de operación, la evolución de OUR, durante el crecimiento de *P. putida* KTH2, sigue el comportamiento típico observado en la mayoría de microorganismos en operación *batch* (Calik y col., 2004; Garcia-Ochoa y col., 2013; Olmos y col., 2013).

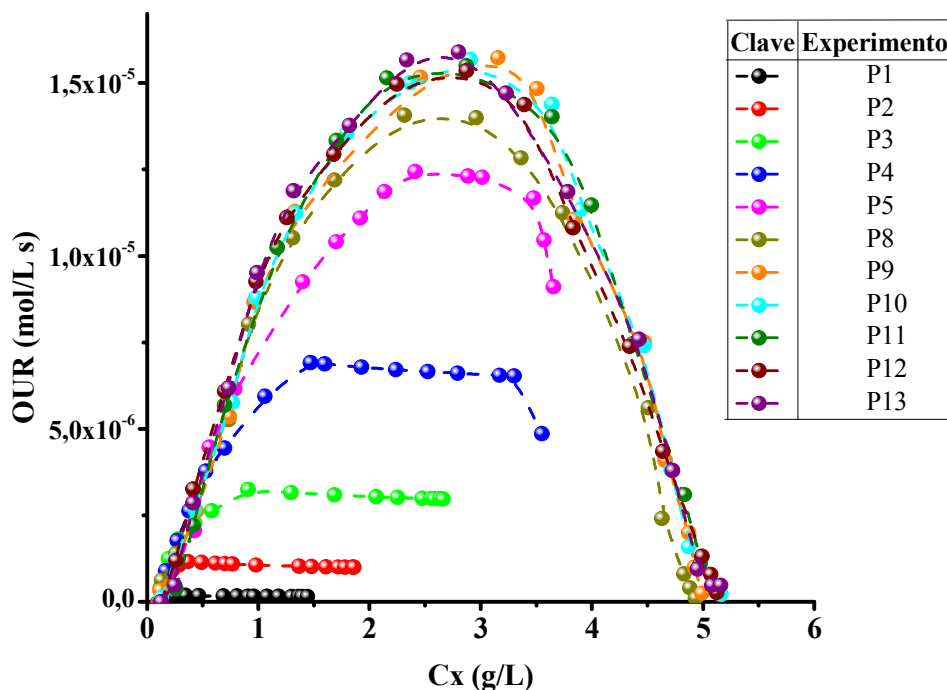


Figura 4.15 - Evolución de OUR con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo.

- **Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno, q_{O_2}**

A partir de los datos de OUR y de la concentración de biomasa, se han determinado los valores del consumo específico, q_{O_2} , según la Ec. [2.4], como se describió en el Apartado 2.3.1.6 del Capítulo de Materiales y Métodos de la presente Memoria.

En las Tablas 4.19 y 4.20 se muestran los valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento, para las distintas velocidades de agitación utilizadas y para un caudal de aire constante de 2 L/min. Los resultados se han representado, a su vez, en la Figura 4.16. Como se puede observar en dicha figura, al igual que sucede con OUR, al aumentar la velocidad de agitación desde 100 hasta 600 rpm, q_{O_2} aumenta a lo largo del crecimiento. Sin embargo, a partir de esta agitación, los valores de q_{O_2} son similares. Asimismo, para el intervalo de velocidades de agitación entre 100 y 500 rpm, q_{O_2} alcanza su valor máximo al inicio del crecimiento para luego disminuir de manera hiperbólica. Sin embargo, para velocidades de agitación superiores, q_{O_2} presenta una evolución prácticamente lineal y decreciente con la concentración celular, como predice la Ec. [3.17].

Para acreditar las distintas limitaciones del crecimiento, consecuencia de la hidrodinámica del biorreactor, durante el cultivo de *P. putida* KTH2 se ha seguido la metodología propuesta por Garcia-Ochoa y col. (2013b) y aplicada con éxito en los cultivos de *X. campestris* y *R. erythropolis* IGTS8. Así, en la Figura 4.17 se ha representado la evolución de q_{O_2} , a un tiempo de crecimiento de 5 h, con la velocidad de agitación. Como puede observarse en dicha figura, para el intervalo de agitaciones de 100 hasta 600 rpm existe limitación de oxígeno; sin embargo, para valores superiores de la agitación, por mucho que se aumente, las condiciones fluidodinámicas no afectan al crecimiento, al contrario de lo que ocurría en cultivos de *R. erythropolis*; es decir, en este caso no existen restricciones fluidodinámicas que puedan producir un daño celular.

Tabla 4.19 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo para los experimentos P1 a P8.

Experimento P1		Experimento P2		Experimento P3		Experimento P4		Experimento P5		Experimento P8	
Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^7$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)
0,19	8,90	0,23	4,02	0,28	6,48	0,53	7,16	0,56	7,96	0,91	8,78
0,24	7,65	0,29	3,67	0,43	5,29	0,70	6,36	0,79	7,79	1,31	8,03
0,31	5,88	0,37	3,13	0,58	4,52	1,06	5,60	1,40	6,60	1,69	7,23
0,35	5,17	0,49	2,32	0,91	3,56	1,47	4,70	1,70	6,12	2,31	6,07
0,46	3,74	0,61	1,81	1,29	2,44	1,60	4,31	1,92	5,79	2,96	4,73
0,69	2,41	0,70	1,57	1,68	1,83	1,93	3,52	2,14	5,55	3,36	3,81
0,81	2,00	0,77	1,42	2,06	1,47	2,24	3,00	2,28	5,36	3,74	3,01
0,91	1,75	0,98	1,08	2,25	1,34	2,52	2,64	2,41	5,16	4,51	1,24
0,96	1,65	1,25	0,83	2,48	1,21	2,79	2,37	2,88	4,26	4,63	0,52
1,08	1,44	1,37	0,75	2,55	1,17	3,17	2,07	3,02	4,07	4,83	0,17
1,18	1,30	1,48	0,69	2,58	1,15	3,3	1,97	3,26	3,67	4,88	0,08
1,30	1,17	1,61	0,63	2,64	1,13			3,57	2,93	4,93	0,02
1,36	1,11	1,72	0,58	2,66	1,12			3,65	2,49		
1,39	1,08	1,78	0,56								
1,44	1,04	1,85	0,54								
		1,86	0,53								

Tabla 4.20 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintas velocidades de agitación del medio de cultivo para los experimentos P9 a P13.

Experimento P9		Experimento P10		Experimento P11		Experimento P12		Experimento P13	
Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)
0,96	8,99	0,98	8,97	1,17	8,75	0,98	9,45	0,99	9,60
1,33	8,48	1,34	8,39	1,70	7,83	1,26	8,83	1,32	9,01
2,46	6,17	1,80	7,53	2,16	7,02	1,68	7,71	1,82	7,56
3,16	4,98	2,36	6,34	2,87	5,39	2,25	6,66	2,33	6,71
3,51	4,23	2,91	5,39	3,64	3,85	2,87	5,34	2,80	5,67
3,84	2,88	3,64	3,95	4,00	2,87	3,39	4,24	3,23	4,56
4,47	1,68	3,90	2,91	4,37	1,71	3,83	2,82	3,78	3,13
4,66	0,88	4,47	1,65	4,83	0,64	4,34	1,70	4,43	1,71
4,87	0,41	4,71	0,81	4,97	0,22	4,64	0,94	4,73	0,80
4,92	0,20	4,87	0,33	5,11	0,07	4,99	0,26	4,95	0,19
4,99	0,05	5,16	0,04			5,07	0,16	5,08	0,09
						5,12	0,05	5,16	0,09

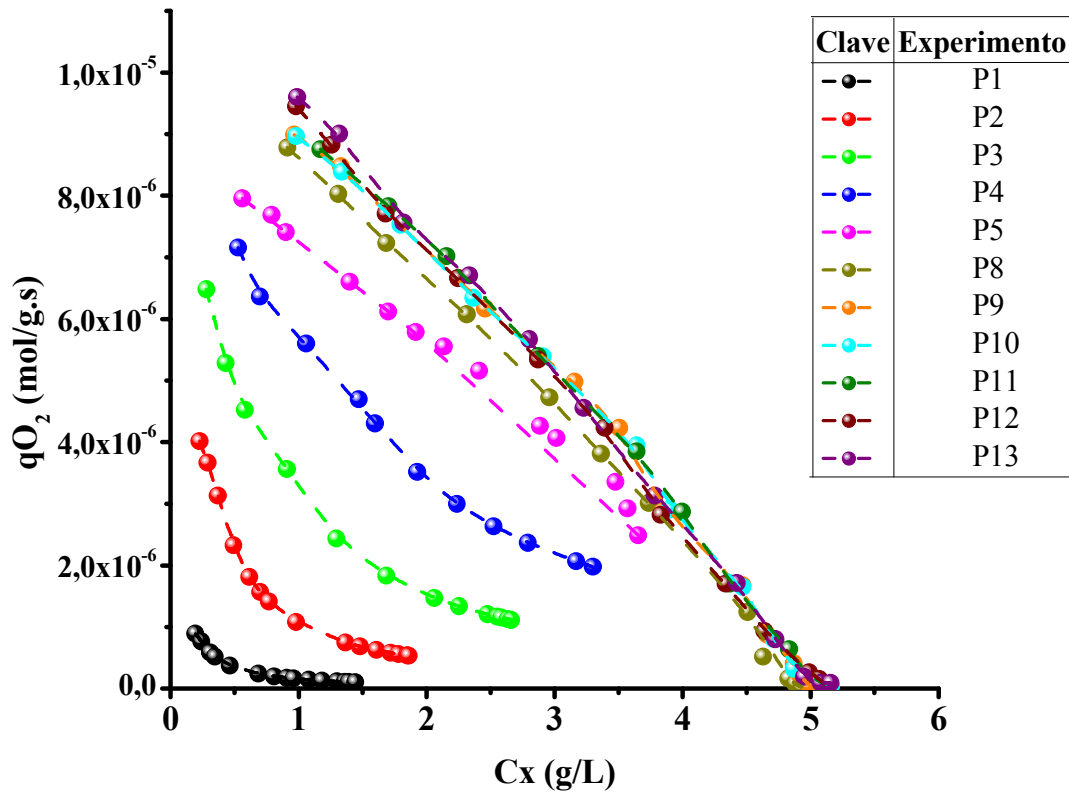


Figura 4.16 - Evolución de q_{O_2} con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo.

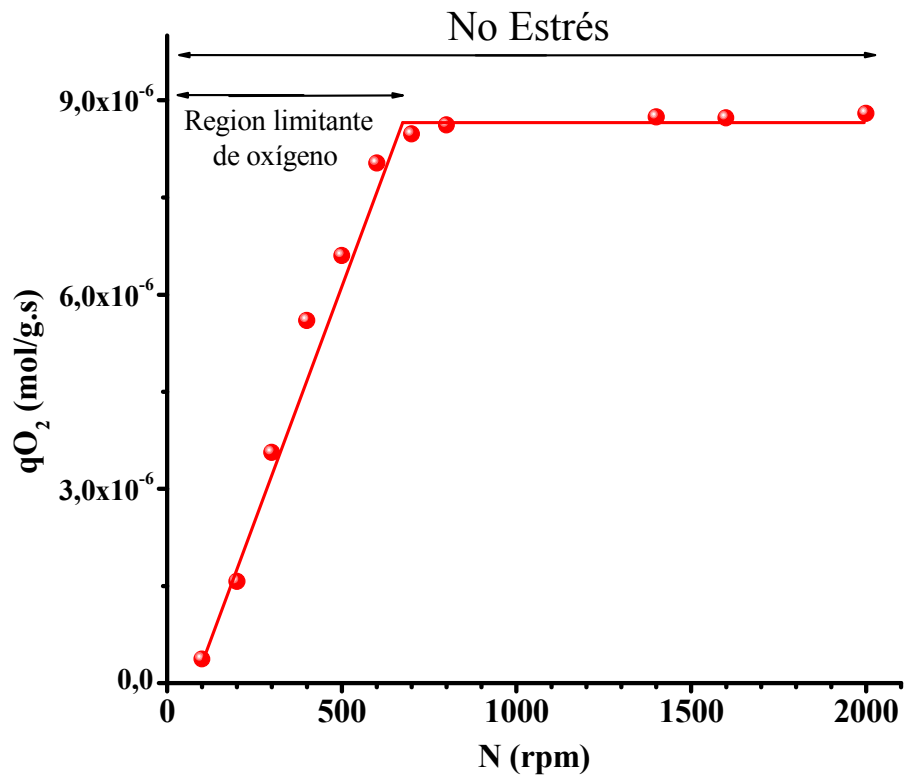


Figura 4.17 - Evolución de q_{O_2} con la velocidad de agitación, para células con un tiempo de crecimiento de 5 h.

4.2. CINÉTICA del CRECIMIENTO de *Pseudomonas putida* natural: VARIACIÓN de los PARÁMETROS del CULTIVO

Del estudio del crecimiento de *P. putida* KTH2 y del análisis de diferentes respuestas (velocidad de crecimiento, concentración máxima de biomas, velocidad de consumo de oxígeno) durante el crecimiento del microorganismo, se puso de manifiesto que el cultivo evoluciona de una forma u otra dependiendo de la concentración de oxígeno disuelto, al modificar la velocidad de agitación del biorreactor.

Con la intención de profundizar en el estudio de estos cultivos y comprobar si el comportamiento observado se debe al hecho de tratarse de un microorganismo modificado genéticamente o si, por el contrario, se debe a una característica propia del género *Pseudomonas*, se ha llevado a cabo un estudio del crecimiento de la cepa natural de *P. putida*.

Así, con el fin de comparar el comportamiento de ambas cepas, se ha realizado un estudio análogo al anterior midiendo la concentración de biomasa, la concentración de oxígeno disuelto, el consumo de las fuentes de carbono -glicerol y ácido glutámico-, y el pH. Asimismo, se ha realizado un estudio de la velocidad de consumo de oxígeno en las mismas condiciones que la cepa KTH2.

4.2.1. Resultados experimentales

Durante el cultivo de *P. putida* natural se han fijado las mismas condiciones de operación que las del cultivo de *P. putida* KTH2. El medio de crecimiento ha sido el descrito en el Apartado 2.1.3 de la presente Memoria y la temperatura se ha mantenido en 30 °C. Durante el crecimiento en biorreactor, se ha seguido el procedimiento experimental descrito en el Apartado 2.3.1.3, se ha registrado en línea la evolución del pH, la temperatura, la agitación, el caudal de aire y el porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo. A su vez, se han extraído muestras, del biorreactor y de los matraces *Erlenmeyer*, en condiciones de esterilidad, para el análisis de la biomasa y de la fuente de carbono (glicerol y ácido glutámico). Para establecer diferentes condiciones hidrodinámicas en el biorreactor, se ha modificado la velocidad de agitación, en un intervalo de 100 a 2000 rpm. En la Tabla 4.21 se muestran, de forma resumida, los

experimentos realizados y las condiciones de operación utilizadas en cada uno de ellos. En las Tablas 4.22 a 4.32 se recogen los resultados experimentales de la evolución de las variables características del crecimiento de *P. putida* natural: concentración de biomasa, de oxígeno disuelto, de glicerol, de ácido glutámico y el pH.

Debido a que los cultivos en biorreactor de la cepa natural de *P. putida* también forma abundantes espumas, fue necesario la utilización del disco rompe-espuma. A su vez, y por las mismas razones descritas en la anterior sección, los experimentos a velocidades de agitación superiores a 500 rpm se llevaron a cabo con un volumen de líquido de 1 L.

Tabla 4.21 - *Condiciones hidrodinámicas establecidas para el cultivo de P. putida natural en biorreactor de tipo tanque agitado.*

Experimento	Velocidad de agitación (rpm)	Volumen de líquido (L)	Caudal de aire (L/min)
Pw1	100	2	2
Pw2	200	2	2
Pw3	300	2	2
Pw4	400	2	2
Pw5	500	2	2
Pw6	600	1	1
Pw7	700	1	1
Pw8	800	1	1
Pw9	1400	1	1
Pw10	2000	1	1
Pw11 (Incubadora)	210	0,050	--

Tabla 4.22 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw1 a Pw6.

Tiempo (h)	Concentración celular, Cx (g/L)					
	Código Experimento					
	Pw1	Pw2	Pw3	Pw4	Pw5	Pw6
0	0,12	0,11	0,11	0,12	0,12	0,13
1	0,17	0,26	0,22	0,23	0,23	0,23
2	0,27	0,38	0,47	0,56	0,35	0,33
3	0,34	0,47	0,63	0,85	0,78	0,65
4	0,42	0,61	0,84	1,05	1,25	1,08
5	0,53	0,73	1,03	1,29	1,61	1,84
6	0,61		1,18	1,42	1,98	2,61
7	0,67	0,90	1,27	1,64	2,62	3,36
8	0,74	0,99	1,45	1,89	3,10	3,91
9			1,60	2,21	3,55	4,36
10			1,83	2,46	3,88	4,69
11	0,91	1,23			4,31	
12					4,55	5,29
13	1,03	1,37	2,15	2,95		
14					4,75	5,57
15	1,13	1,50	2,37	3,27		
16					4,99	
17	1,23	1,62	2,57	3,53		
19	1,28		2,74	3,74		
20	1,36	1,76				
21		1,82	2,84	3,83		
22	1,46	1,87				
23		1,91	3,00	4,02		
24	1,50					
25	1,52		3,10			
26		2,01				
27	1,54	2,06	3,20			
30	1,57	2,16	3,27			

Tabla 4.23 - Evolución de la concentración de biomasa celular durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw7 a Pw11.

Tiempo (h)	Concentración celular, Cx (g/L)				
	Código Experimento				
	Pw7	Pw8	Pw9	Pw10	Pw11
0	0,12	0,13	0,13	0,12	0,11
2	0,32	0,35	0,40	0,34	0,45
3	0,59	0,67	0,71	0,63	0,71
4	1,12	1,22	1,20	1,17	
5	1,76	1,91	1,88	1,95	
6	2,57	2,74	2,70	2,63	2,25
7	3,42	3,58	3,44	3,48	
8	3,89	4,06	4,00	3,96	3,01
9	4,70	4,65		4,55	
10	4,93		5,00	5,01	3,65
11	5,42	5,37	5,42	5,47	
12	5,65	5,60	5,66	5,71	
13					4,28
14	5,74	5,69	5,70	5,80	
15					4,66
17					4,78
19					4,83

Tabla 4.24 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw1 a Pw3.

Experimento Pw1		Experimento Pw2		Experimento Pw3	
Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O ₂ disuelto (%)
0,00	99,40	0,00	97,80	0,00	99,00
0,10	73,70	0,25	76,27	0,50	77,80
0,20	57,80	0,50	55,40	1,00	47,50
0,30	49,00	0,75	41,52	1,50	17,50
0,40	43,40	1,00	27,90	3,00	0,00
0,70	24,80	1,20	15,00	4,00	0,00
0,80	26,80	1,50	0,00	5,00	0,00
1,00	7,20	4,00	0,00	6,00	0,00
2,00	0,00	5,00	0,00	7,00	0,00
3,00	0,00	7,00	0,00	8,00	0,00
4,00	0,00	8,00	0,00	9,00	0,00
5,00	0,00	11,00	0,00	10,00	0,00
6,00	0,00	13,00	0,00	13,00	0,00
7,00	0,00	15,00	0,00	15,00	0,00
8,00	0,00	17,00	0,00	17,00	0,00
11,00	0,00	20,00	0,00	19,00	0,00
13,00	0,00	21,00	0,00	21,00	0,00
15,00	0,00	22,00	0,00	23,00	0,00
17,00	0,00	23,00	0,00	25,00	0,00
19,00	0,00	26,00	0,00	27,00	0,00
20,00	0,00	27,00	0,00	30,00	0,00
22,00	0,00	30,00	0,00		
24,00	0,00				
25,00	0,00				
27,00	0,00				
30,00	0,00				

Tabla 4.25 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw4 a Pw6.

Experimento Pw4		Experimento Pw5		Experimento Pw6	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	98,50	0,00	98,70	0,00	99,06
0,50	82,80	0,50	95,20	0,50	94,98
1,00	64,80	1,00	88,90	1,00	89,11
1,50	45,90	1,50	76,28	2,00	73,79
1,80	28,13	2,00	63,90	2,50	62,00
2,00	16,30	2,50	47,40	3,00	51,00
2,50	1,00	2,75	32,10	3,50	42,78
3,00	1,40	3,00	17,10	4,00	25,00
4,50	0,40	4,00	8,41	5,00	12,00
5,50	0,00	5,50	0,00	6,00	8,00
8,00	0,00	6,50	0,00	7,00	6,05
10,50	0,00	8,00	0,00	8,00	12,11
13,50	0,00	9,50	0,00	9,00	25,89
15,50	0,00	11,50	0,00	10,00	44,00
18,50	0,00	12,00	0,00	11,00	61,86
20,50	0,00	12,50	5,70	12,00	80,16
21,00	0,00	13,00	11,00	14,00	98,00
21,50	2,20	13,50	16,40		
22,00	5,30	15,00	26,30		
22,50	10,00	16,50	36,80		
23,50	15,90	17,50	51,70		
24,50	24,40	18,50	64,10		
25,50	30,50	19,50	72,00		
26,50	38,10	20,50	82,40		
27,50	51,20	21,50	94,70		
28,50	62,70				
29,50	76,20				
30,00	84,20				

Tabla 4.26 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw7 y Pw8.

Experimento Pw7		Experimento Pw8	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	99,89
0,50	99,10	0,50	98,00
1,00	97,80	1,00	95,13
2,00	85,41	2,00	88,93
3,00	73,46	3,00	80,04
4,00	53,20	4,00	67,44
5,00	36,97	5,00	55,55
5,50	31,14	6,00	51,22
6,50	26,41	7,00	50,77
7,00	25,99	8,03	58,66
8,00	34,00	9,00	69,34
9,00	49,58	10,50	85,89
10,00	65,96	12,00	95,41
11,00	79,43	14,00	98,97
12,00	92,00		
14,00	99,90		

Tabla 4.27 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw9 y Pw10.

Experimento Pw9		Experimento Pw10	
Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)	Tiempo (h)	O₂ disuelto (%)
0,00	100,00	0,00	99,98
0,50	99,40	0,50	99,60
1,00	98,60	1,00	99,30
2,00	94,92	1,50	98,85
3,00	91,66	2,00	98,29
4,00	87,12	3,00	97,10
5,00	83,10	4,00	95,27
6,00	81,26	5,00	93,38
7,00	81,05	6,00	92,86
8,00	83,44	7,00	92,76
9,00	87,84	8,03	93,53
10,00	92,37	9,00	95,04
11,00	95,68	10,00	96,81
12,00	98,18	11,00	97,62
14,00	99,90	12,00	99,06
		14,00	99,90

Tabla 4.28 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw1 a Pw6.

Tiempo (h)	Concentración de glicerol, (g/L)					
	Código Experimento					
	Pw1	Pw2	Pw3	Pw4	Pw5	Pw6
0	2,06	2,02	2,02	2,00	2,08	2,07
1		2,00	2,02			1,91
2	1,99	1,98	1,97	1,94	1,95	
3	1,98	1,96	1,88	1,84	1,76	1,51
4	1,96	1,93	1,82	1,66	1,41	1,22
5	1,93		1,73	1,47	1,12	0,94
6	1,89	1,80	1,63	1,29	0,83	0,61
7	1,84		1,54	1,11	0,48	0,29
8	1,79	1,67	1,41	0,89	0,21	
9	1,75	1,61	1,30	0,62	0,00	
10		1,53	1,14	0,45		
11				0,25		
12	1,57	1,35	0,81	0,06		
13			0,62	0,00		
14	1,44	1,18	0,45			
15	1,36					
16		0,95	0,12			
17	1,19		0,00			
19	1,02	0,63				
20	0,92	0,53				
21		0,41				
22	0,66	0,27				
23		0,12				
24		0,00				
25	0,27					
27	0,00					

Tabla 4.29 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw7 a Pw11.

Tiempo (h)	Concentración de glicerol, (g/L)				
	Código Experimento				
	Pw7	Pw8	Pw9	Pw10	Pw11
0	1,97	2,01	1,95	2,01	2,07
1			1,82	1,87	
2	1,56	1,55	1,60	1,54	1,99
3	1,26	1,31	1,36	1,30	1,72
4	1,08	1,03	1,12	0,94	1,47
5	0,76	0,69	0,71	0,60	1,17
6	0,49	0,44	0,47	0,39	0,89
7	0,05	0,00	0,07	0,00	
8					0,28
9					0,00

Tabla 4.30 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw1 a Pw6.

Tiempo (h)	Concentración de ácido glutámico, (g/L)					
	Código Experimento					
	Pw1	Pw2	Pw3	Pw4	Pw5	Pw6
0	20,07	19,83	19,85	19,87	19,98	19,97
1	19,93		19,66	19,64	19,70	
2	19,85	19,77	19,54	19,37	19,55	18,40
3	19,79			18,87	18,60	17,43
4	19,72	19,56	19,37	18,30	17,60	15,93
5	19,62	19,48	18,85	17,71	16,40	14,58
6	19,54		18,53	17,40	15,00	13,18
7	19,48	19,28	18,26	16,81	13,60	12,01
8	19,40	19,17			12,30	
9					10,79	9,12
10		18,97		14,95	9,17	
11	19,22		17,40	14,41		5,28
12				13,81	6,70	
13	19,06		16,76	13,27		
14		18,53		12,32	5,50	2,56
15			16,13			
16	18,84			10,56	4,93	
17			15,47			
18		18,04				
19	18,66		14,41	8,69		
20	18,55	17,82	13,88			
21		17,72		7,57		
22	18,30					
23		17,43	12,67	6,61		
24		17,12				
25	18,13		11,75			
27	18,00	16,54				
30	17,45	16,03	9,96			

Tabla 4.31 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw7 a Pw11.

Tiempo (h)	Concentración de ácido glutámico, (g/L)				
	Código Experimento				
	Pw7	Pw8	Pw9	Pw10	Pw11
0	19,99	20,09	19,90	20,05	20,10
1		19,12	16,87		19,78
2	17,31			15,87	19,65
3	15,86	16,11			19,21
4	14,59	14,73	14,26		18,45
5	13,12	13,30		12,70	17,41
6	12,05	12,11	11,54		16,40
7	11,12	10,86	10,30	10,70	
9	7,78	7,20	6,32	6,48	13,15
11					10,66
12	2,94	2,45		2,25	
14	1,34	0,99	1,13	0,92	8,00
16					6,91
19					6,04

Tabla 4.32 - Evolución del pH durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación para los experimentos Pw1 a Pw10.

Tiempo (h)	pH									
	Código Experimento									
	Pw1	Pw2	Pw3	Pw4	Pw5	Pw6	Pw7	Pw8	Pw9	Pw10
0	6,28	6,38	6,41	6,40	6,34	6,39	6,40	6,40	6,38	6,42
1	6,32	6,43	6,46	6,45	6,40	6,44	6,44	6,44	6,48	6,46
2	6,36	6,47	6,53	6,52	6,49	6,52	6,55	6,55	6,57	6,54
3	6,39	6,51	6,60	6,63	6,65	6,68	6,73	6,73	6,78	6,71
4	6,43	6,55	6,63	6,77	6,87	6,93	7,04	7,04	7,07	6,97
5	6,47	6,59	6,71	6,90	7,06	7,24	7,38	7,38	7,39	7,31
6	6,52	6,64	6,79	7,03	7,26	7,49	7,63	7,63	7,58	7,56
7	6,56	6,69	6,87	7,18	7,49	7,64	7,84	7,84	7,81	7,84
8	6,61	6,74	6,95	7,36	7,66	8,11	8,01	8,05	7,97	8,15
9	6,66	6,79	7,04	7,51	7,87	8,25	8,27	8,31	8,23	8,29
10	6,70	6,84	7,12	7,64	8,10	8,36	8,43	8,47	8,39	8,40
11	6,74	6,90	7,19	7,78	8,27	8,44	8,56	8,61	8,52	8,48
12	6,78	6,95	7,26	7,90	8,39	8,52	8,65	8,70	8,61	8,56
13	6,81	7,01	7,31	8,04	8,48	8,58	8,74	8,79	8,70	8,62
14	6,85	7,06	7,40	8,17	8,55	8,68	8,81	8,86	8,77	8,72
15	6,88	7,13	7,49	8,26	8,61					
16	6,92	7,19	7,56	8,34	8,70					
17	6,94	7,24	7,63	8,40						
18	6,98	7,30	7,70	8,46						
19	7,00	7,35	7,83	8,50						
20	7,04	7,40	7,98	8,54						
21	7,07	7,45	8,09	8,58						
22	7,10	7,48	8,17	8,61						
23	7,13	7,51	8,24	8,64						
24	7,17	7,58	8,31							
25	7,20	7,69	8,37							
26	7,27	7,78	8,42							
28	7,37	7,87	8,47							
28	7,40	7,94	8,51							
29	7,50	8,01	8,54							
30	7,59	8,07	8,57							

4.2.1.1. Discusión de los resultados

En la Figura 4.18 se muestra la evolución de la biomasa a partir de los valores recogidos en las Tablas 4.22 y 4.23. En la citada figura se puede apreciar que las curvas de crecimiento de *P. putida* natural presentan el mismo comportamiento, con la velocidad de agitación, que la *Pseudomonas* modificada, KTH2. Así, para velocidades de agitación bajas (de 100 a 500 rpm) los crecimientos no presentan fase de latencia, mientras que a velocidades de agitación altas (de 600 a 2000 rpm), la evolución es la típica de un cultivo en *batch*. Sin embargo, aunque el efecto que ejerce la agitación sobre el crecimiento es análogo al de la cepa KTH2, las células de la cepa natural alcanzan una mayor concentración de biomasa bajo las mismas condiciones de operación. De esta manera, por ejemplo, a 100 rpm, la concentración máxima de biomasa es 1,57 g/L, en un tiempo de crecimiento de 30 h, pasando a un valor medio aproximado de 5,70 g/L a las 14 h, para el intervalo de agitaciones comprendidas entre 600 y 2000 rpm.

En cuanto a la evolución del oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural, los valores experimentales mostrados en las Tablas 4.24 a 4.27, se han representado en la Figura 4.19. En dicha figura se puede observar que la concentración del oxígeno disuelto, para todas las velocidades de agitación, tiene una tendencia semejante a la observada en los cultivos de *P. putida* KTH2, aunque en este caso se aprecia una caída más rápida de la concentración de oxígeno disuelto; es decir, bajo las mismas condiciones, la velocidad de consumo de oxígeno de la cepa natural es mayor.

En cuanto al consumo de las fuentes de carbono, los resultados experimentales de la concentración de glicerol y de ácido glutámico mostrados en las Tablas 4.28 a 4.31, se han representado en las Figuras 4.20 y 4.21, respectivamente. Como puede observarse ambos nutrientes son consumidos simultáneamente a lo largo del crecimiento, aunque la cepa natural tiene una mayor velocidad de consumo que la modificada. Así, por ejemplo, a las 30 h del crecimiento y 100 rpm, se ha consumido todo el glicerol (2 g/L) y 2,55 g/L de ácido glutámico; mientras que para el intervalo de agitaciones de 700 a 2000 rpm se consume, en las primeras 7 h, todo el glicerol y al final del crecimiento, en torno a las 14 h, aproximadamente 19 g/L de ácido glutámico.

A partir de la Ec. [4.1] se puede determinar la cantidad de biomasa que se ha producido por unidad de sustrato consumido. De esta manera, en las Figuras 4.22 y 4.23

se muestran las evoluciones de los rendimientos de glicerol y de ácido glutámico en biomasa a lo largo del tiempo, respectivamente. Como puede observarse en las citadas figuras, los rendimientos muestran comportamientos análogos a los descritos en el caso de la cepa KTH2 (ver Figuras 4.5 y 4.6), tanto para velocidades de agitación bajas -entre 100 y 500 rpm, como para velocidades de agitación altas -entre 600 y 2000 rpm. Sin embargo *P. putida* natural tiene un menor rendimiento de sustratos en biomasa que *P. putida* KTH2.

Finalmente, en la Figura 4.24 se muestra la evolución del pH a lo largo del cultivo en las diferentes condiciones. Como se puede observar, el pH aumenta a lo largo del crecimiento para todas las condiciones estudiadas, de forma análoga a lo observado en los cultivos de la cepa KTH2 (Figura 4.7).

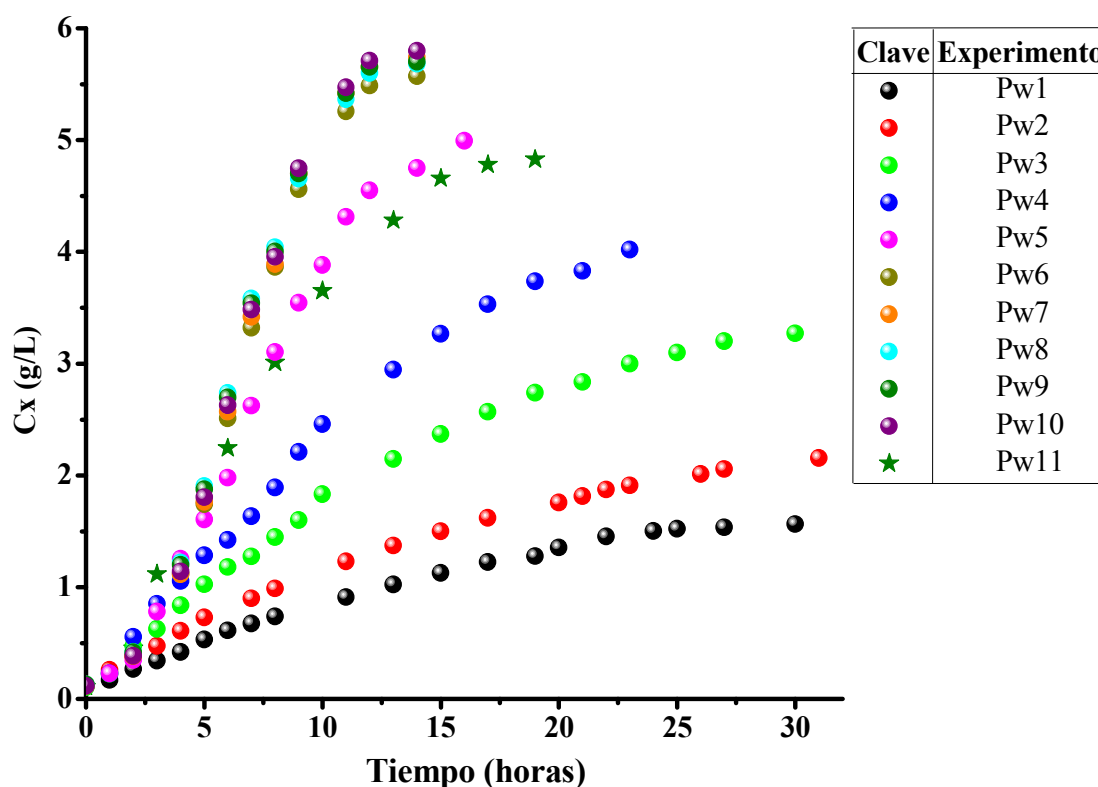


Figura 4.18 - Evolución de la biomasa durante el cultivo de *P. putida* natural bajo distintas velocidades de agitación del cultivo.

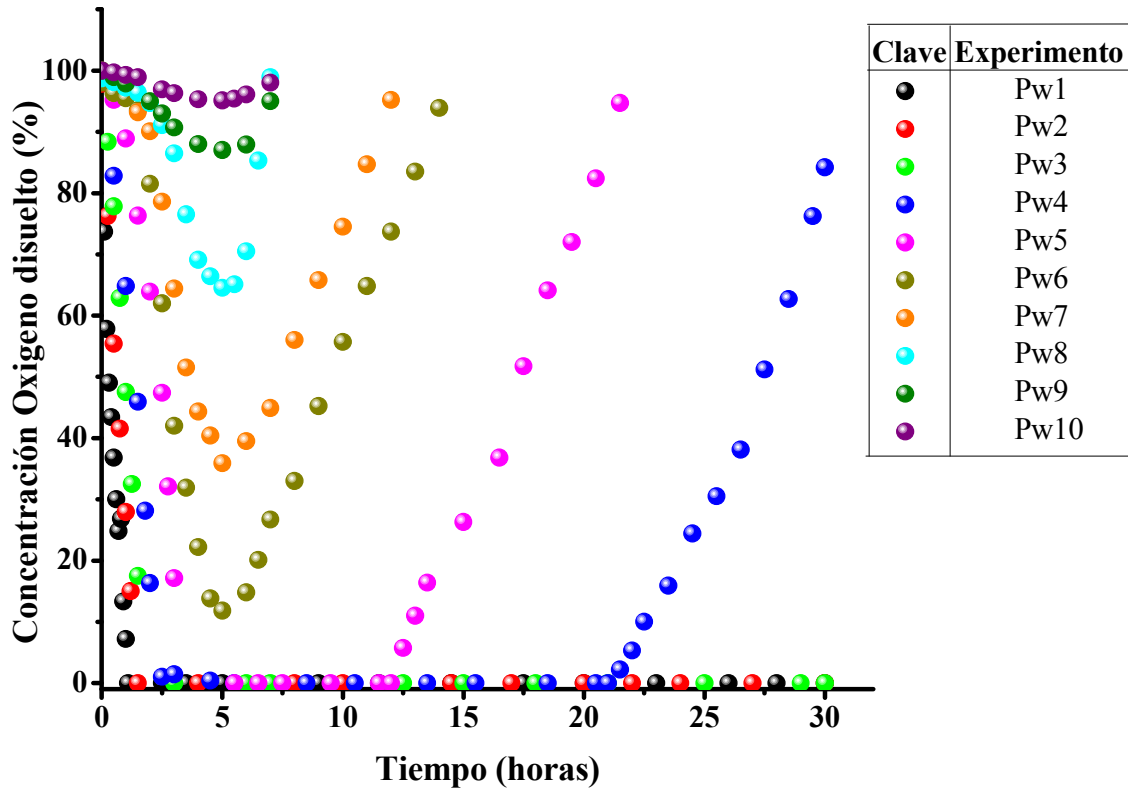


Figura 4.19 - Evolución de la concentración de oxígeno disuelto durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

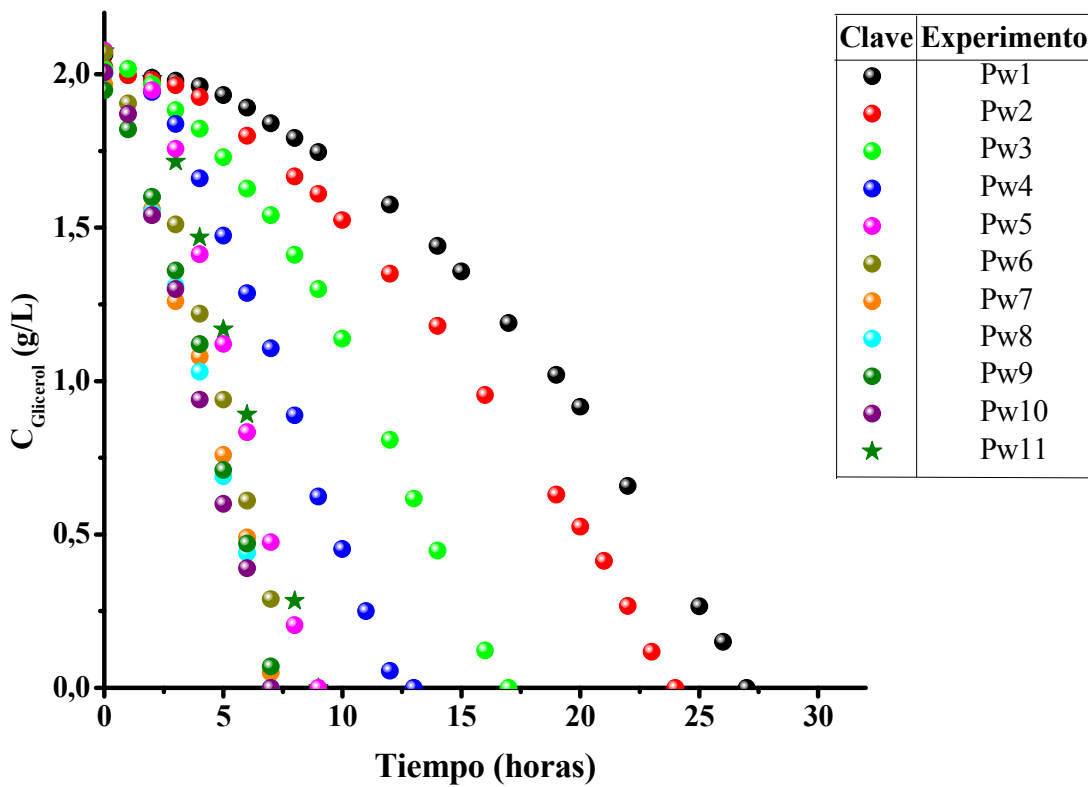


Figura 4.20 - Evolución de la concentración de glicerol durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

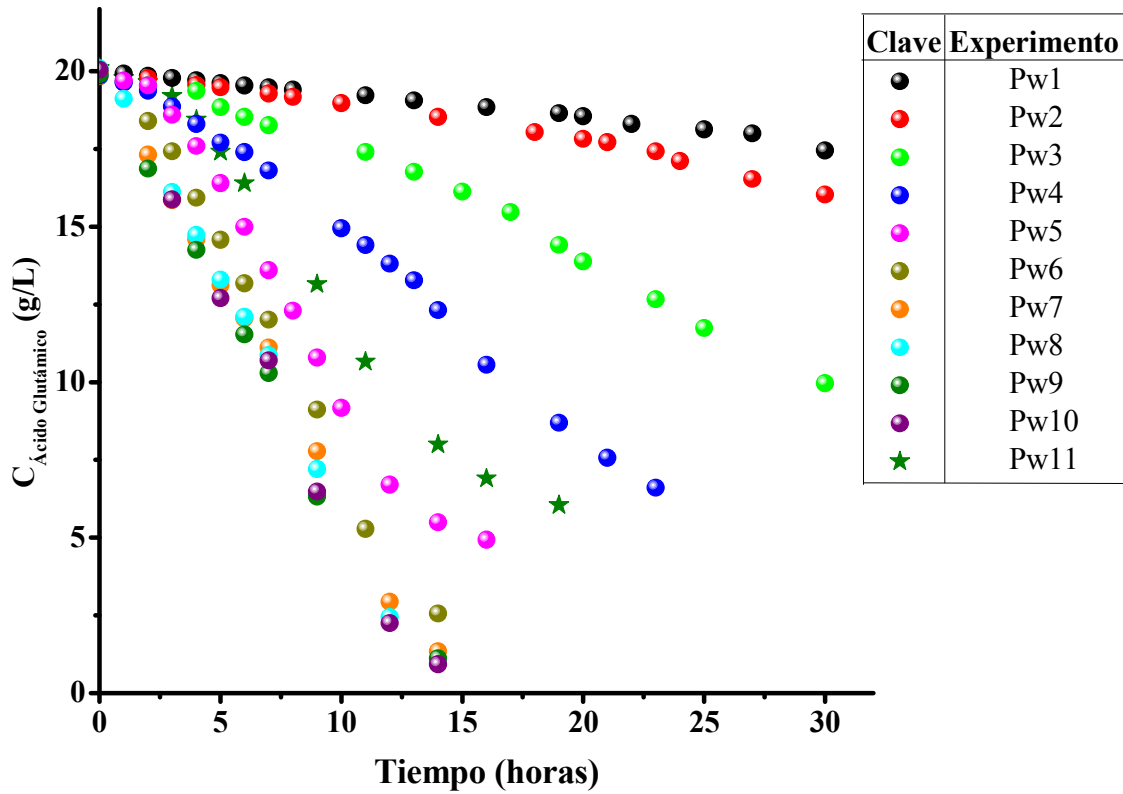


Figura 4.21 - Evolución de la concentración de ácido glutámico durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

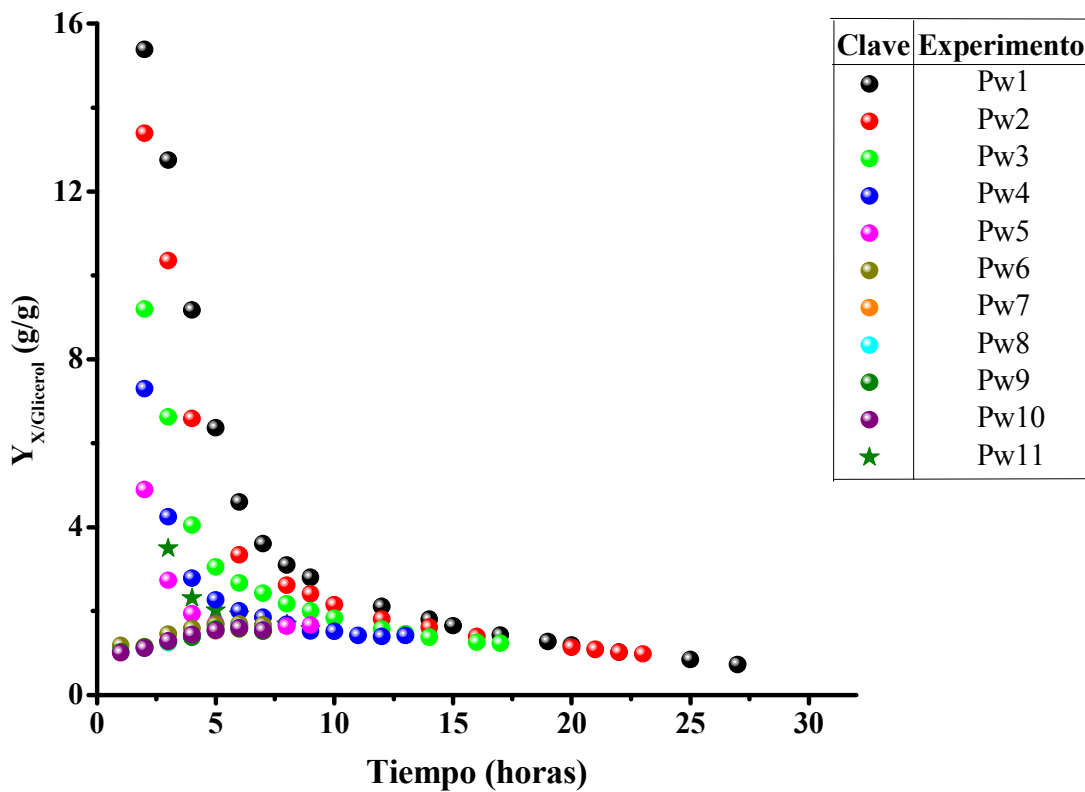


Figura 4.22 - Evolución del rendimiento de glicerol en biomasa durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

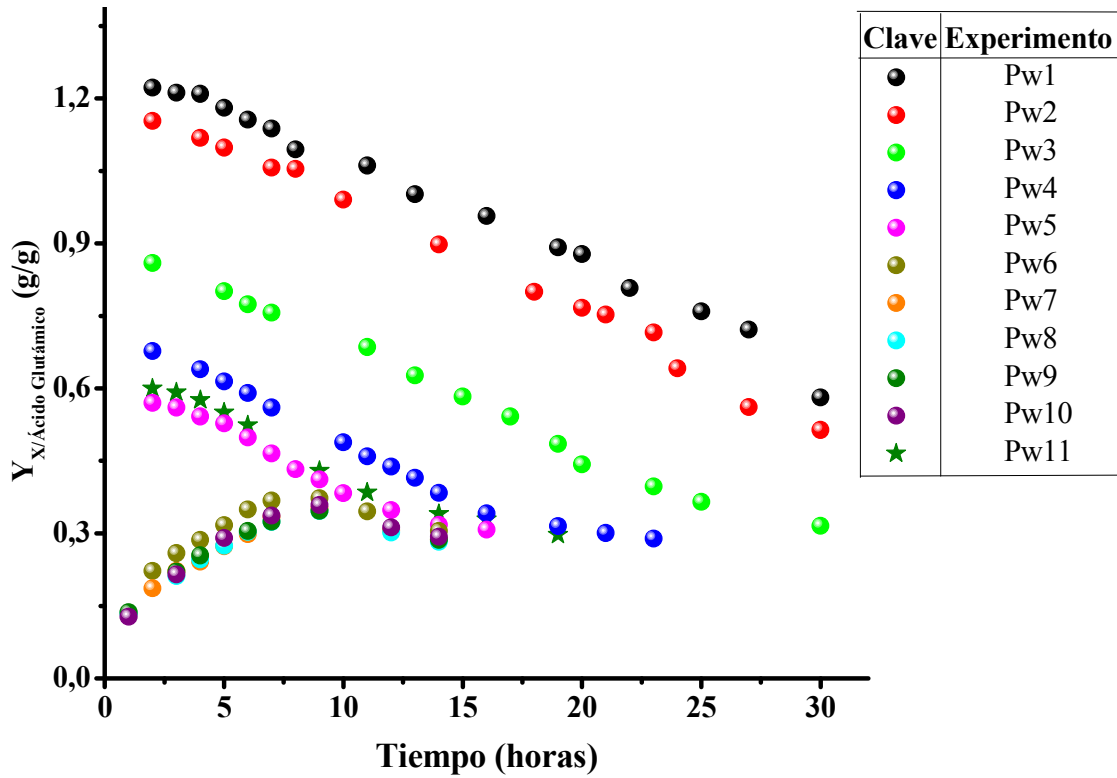


Figura 4.23 - Evolución del rendimiento de ácido glutámico en biomasa durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

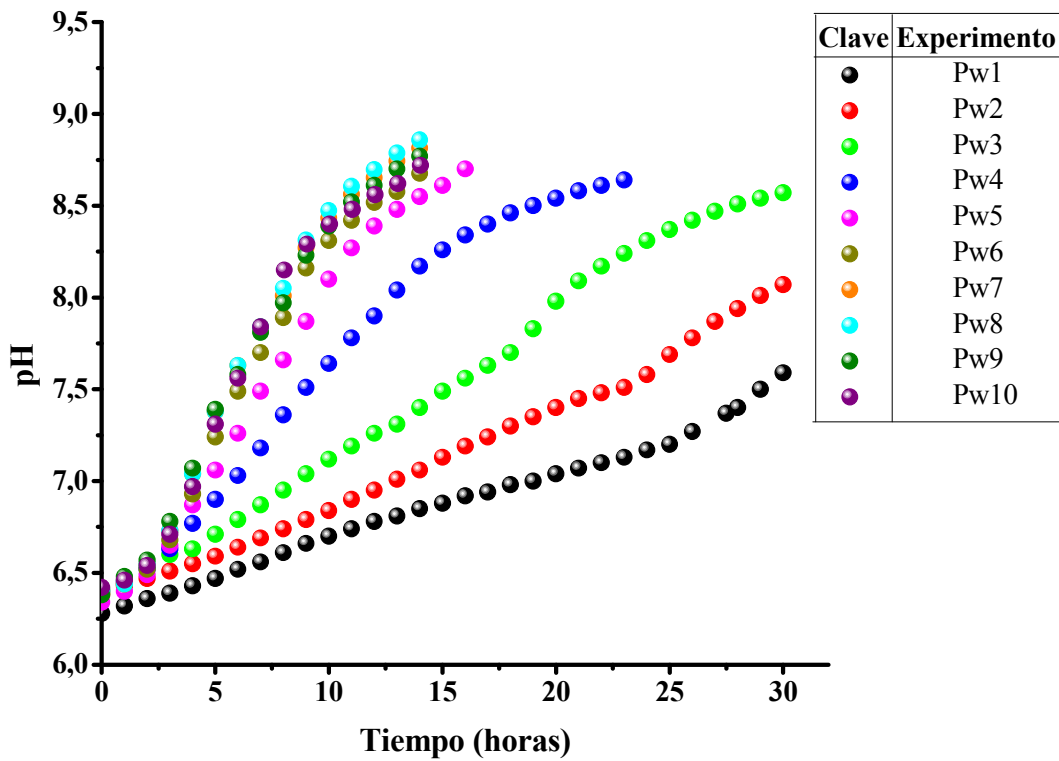


Figura 4.24 - Evolución del pH durante el cultivo de *P. putida* natural con la velocidad de agitación.

4.2.2. Modelo cinético del crecimiento

En este apartado se ha utilizado la misma metodología y se han seguido los mismos pasos descritos en la determinación del modelo cinético de *P. putida* KTH2; aunque ya se vio que la ecuación logística (Ec. [3.13]) no era un modelo adecuado para la descripción de la cinética del crecimiento, esta ecuación se ha empleado para la modelización del crecimiento de *P. putida* natural.

Para la determinación de los parámetros cinéticos, se ha ajustado la ecuación [3.13], a los datos experimentales de concentración de biomasa (C_x) y tiempo (t), fijando el valor de C_x^0 en su valor experimental. En la Tabla 4.33 se muestran los valores óptimos de los parámetros del modelo cinético (μ y C_x^{max}) y los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones. En la Figura 4.25 se han representado los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la simulación del modelo cinético. Como puede observarse, al igual que en el caso de la cepa KTH2, aunque el modelo cumple los criterios estadísticos, únicamente es capaz de simular satisfactoriamente los experimentos realizados a velocidades de agitación altas, de 600 a 2000 rpm. En la Figura 4.26 se ha representado la variación de la velocidad de crecimiento, $r_x = dC_x/dt$, con el tiempo. En dicha figura se ve reflejado claramente un comportamiento análogo al observado en *P. putida* KTH2, tanto para velocidades de agitación bajas -entre 100 y 500 rpm-, como para el grupo de experimentos realizados a velocidades de agitación altas -de 600 a 2000 rpm-.

Para confirmar los resultados mostrados anteriormente se ha representado, en la Figura 4.27, la influencia de la velocidad de agitación en el factor de efectividad para el crecimiento, η , y en la concentración de biomasa máxima alcanzada, C_x^{max} . Como puede observarse, la evolución de η y C_x^{max} es análoga a la obtenida con la ecuación logística en *P. putida* KTH2 (Figura 4.10). Además, el factor de efectividad presenta una evolución poco realista, debido a que la ecuación logística no es capaz de simular satisfactoriamente el crecimiento de *Pseudomonas putida* natural.

Tabla 4.33 - Valores de los parámetros calculados, proporcionados por el ajuste de la ecuación logística.

Exp.	C_x^0 (g/L)	μ (h ⁻¹)	Δ	C_x^{max} (g/L)	Δ	SRC	F de Fisher	
							Obtenido	Tabulado (95 %)
Pw1	0,12	0,424	± 0,019	1,403	± 0,055	0,014	912	2,362
Pw2	0,11	0,421	± 0,029	1,807	± 0,081	0,031	603	2,384
Pw3	0,11	0,435	± 0,024	2,783	± 0,129	0,047	890	2,384
Pw4	0,12	0,473	± 0,025	3,498	± 0,192	0,057	865	2,496
Pw5	0,13	0,551	± 0,014	4,687	± 0,140	0,015	4720	2,441
Pw6	0,13	0,584	± 0,004	5,614	± 0,050	0,001	6502	2,567
Pw7	0,12	0,599	± 0,005	5,756	± 0,074	0,002	3116	2,523
Pw8	0,13	0,608	± 0,006	5,644	± 0,071	0,002	3180	2,567
Pw9	0,13	0,602	± 0,006	5,708	± 0,072	0,002	3214	2,567
Pw10	0,12	0,604	± 0,006	5,796	± 0,077	0,003	2910	2,523
Pw11	0,11	0,537	± 0,040	4,492	± 0,240	0,053	1075	2,738

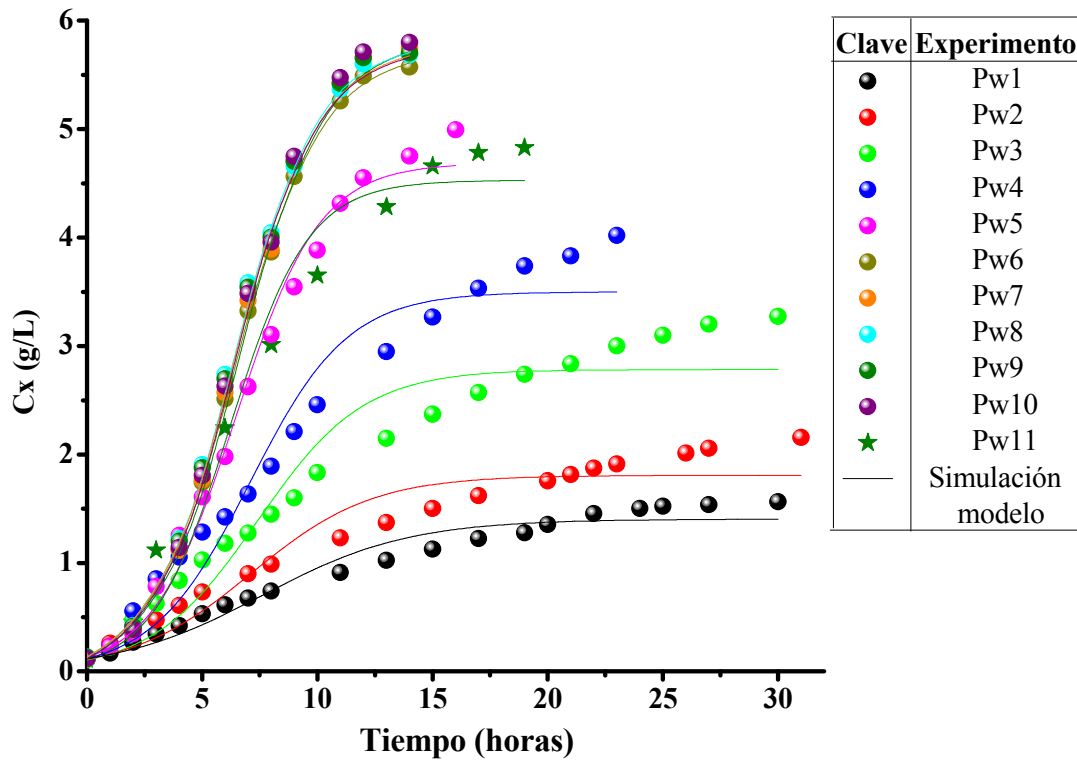


Figura 4.25 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la ecuación logística (—) del cultivo de *P. putida* natural bajo distintas velocidades de agitación.

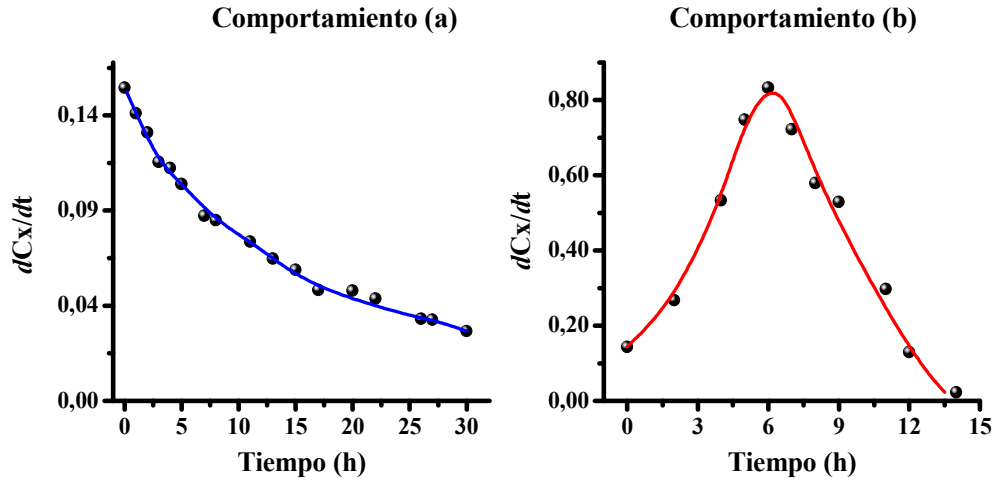
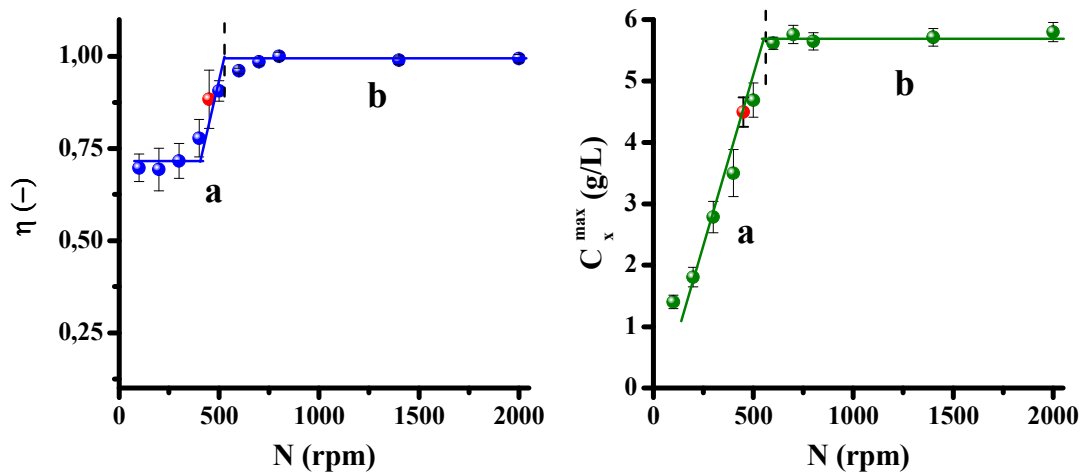


Figura 4.26 - Diferencias de comportamiento de la evolución de la velocidad de crecimiento (r_x) de *P. putida* natural. (a): agitaciones bajas (100 a 500 rpm) y (b): agitaciones altas (600 a 2000 rpm).



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.27 – Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , y la concentración de biomasa máxima, C_X^{\max} , en cultivos de *P. putida* natural. (●, ●) Experimentos Pw1 a Pw10 y (●) Experimento Pw11.

- **Modelo cinético dependiente del oxígeno**

De nuevo, a raíz de los resultados obtenidos empleando la ecuación logística y con el fin de valorar cómo el crecimiento celular puede verse modulado por la concentración de oxígeno (como sustrato limitante), se ha empleado la ecuación de Monod dependiente de la concentración de oxígeno (Ec. [4.2]).

Para la determinación de los parámetros del modelo cinético (μ y K_s), se ha ajustado la Ec. [4.2] a los datos experimentales de concentración de biomasa y oxígeno disuelto (C_x y C_{O_2}) y tiempo (t). En la Tabla 4.34 se muestran los valores de los parámetros del modelo cinético (μ y K_s) para los experimentos Pw1 a Pw10. En la misma tabla se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones realizadas y en la Figura 4.28 se han representado frente al tiempo, junto a la predicción proporcionada por el modelo cinético. Como se observa en dicha figura, aunque estadísticamente el modelo es correcto, éste únicamente es capaz de simular satisfactoriamente los experimentos realizados a velocidades de agitación bajas, de 100 a 500 rpm.

Asimismo, en la Figura 4.29 se ha representado la evolución de η en función de N , de acuerdo a un crecimiento descrito por la Ec. [4.2]. Como se puede observar, la evolución de η es semejante a la obtenida con la cepa KTH2 (Figura 4.12), lo que, a su vez, pone de manifiesto, que la ecuación dependiente del oxígeno (Ec. [4.2]) no es una buena expresión para la descripción del crecimiento de *Pseudomonas* a elevadas velocidades de transporte de oxígeno. Por tanto, a raíz de estos resultados, en el siguiente apartado, se ha utilizado el modelo matemático compuesto que ha dado buenos resultados en el caso del crecimiento de *P. putida* KTH2.

Tabla 4.34 - Valores de la velocidad específica de crecimiento, μ , proporcionada por el ajuste del modelo cinético dependiente de oxígeno

Exp.	μ ($\frac{g}{L \cdot h}$)	Δ	$K_s \cdot 10^6$ (g/L)	Δ $\cdot 10^7$	SRC	F de Fisher	
						Obtenido	Tabulado (95 %)
Pw1	0,090	$\pm 0,001$	0,503	$\pm 0,603$	0,007	11566	2,054
Pw2	0,123	$\pm 0,002$	0,941	$\pm 0,641$	0,008	25644	2,097
Pw3	0,179	$\pm 0,002$	0,704	$\pm 0,332$	0,006	38051	2,097
Pw4	0,230	$\pm 0,004$	2,047	$\pm 0,280$	0,006	10690	2,152
Pw5	0,290	$\pm 0,004$	3,219	$\pm 0,474$	0,008	6520	2,216
Pw6	0,441	$\pm 0,020$	6,071	$\pm 6,816$	0,031	405	2,281
Pw7	0,444	$\pm 0,019$	5,636	$\pm 6,882$	0,030	390	2,243
Pw8	0,454	$\pm 0,019$	6,212	$\pm 6,941$	0,029	415	2,281
Pw9	0,447	$\pm 0,020$	9,946	$\pm 6,910$	0,030	422	2,281
Pw10	0,450	$\pm 0,020$	5,938	$\pm 7,066$	0,030	396	2,248

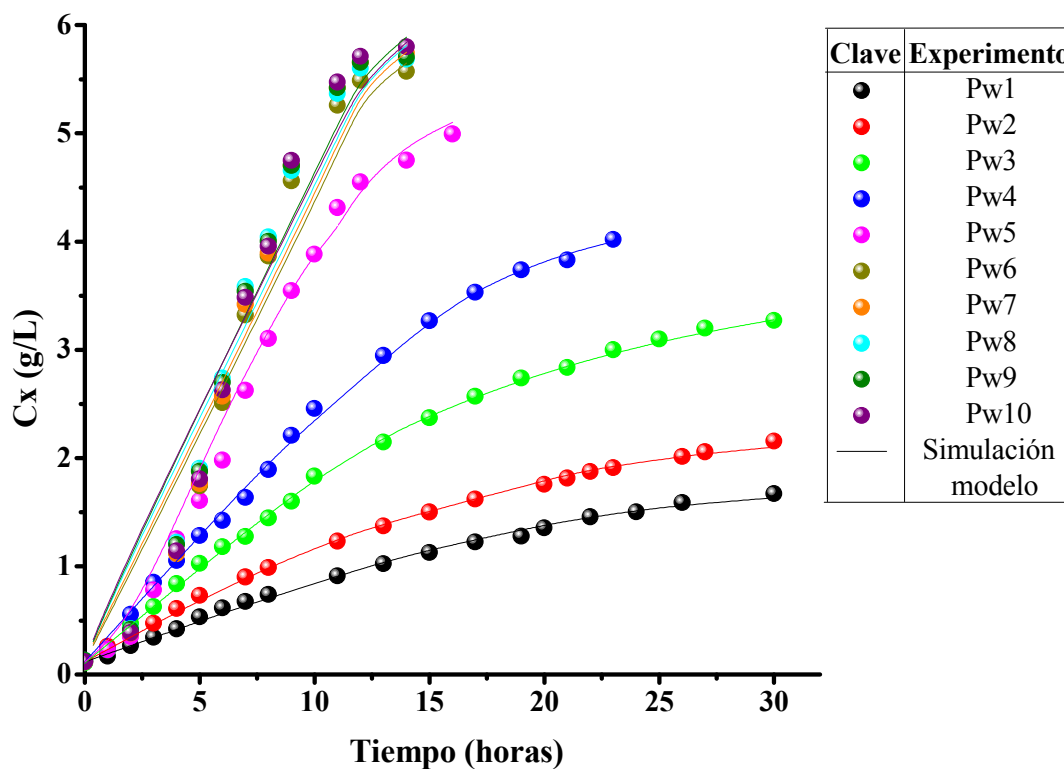
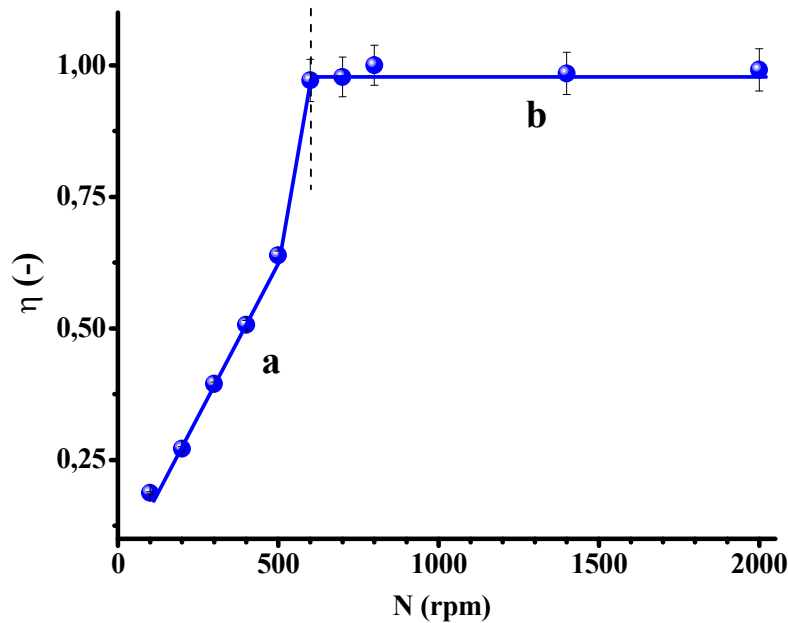


Figura 4.28 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la Ec. [4.2] (—) del cultivo de *P. putida* natural bajo distintas velocidades de agitación.



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.29 - Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , en cultivos de *P. putida* natural. Experimentos Pw1 a Pw10.

- **Modelo cinético compuesto**

Debido a las deficiencias observadas en los modelos anteriores en la descripción del crecimiento, en este apartado se plantea la utilización de la ecuación de tipo Monod compuesta, Ec. [4.3], al igual que se hizo con *P. putida* KTH2.

Para la determinación del parámetro cinético (μ) se ha ajustado la ecuación [4.3], a los datos experimentales de concentración de biomasa y oxígeno disuelto (C_x y C_{O_2}) y tiempo (t). Dado que las constantes de saturación, K_1 y K_2 , varían dependiendo de las condiciones de operación, se han fijado en un valor medio de $1,41 \cdot 10^{-6}$ y 48,2 (g/L), respectivamente. En la Tabla 4.35 se muestran los valores óptimos del parámetro del modelo cinético para los experimentos Pw1 a Pw10. A su vez, en la misma tabla, se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las regresiones realizadas.

En la Figura 4.30 se muestran los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la predicción proporcionada al aplicar el modelo cinético con

el valor óptimo de los parámetros. Como se puede observar, el modelo reproduce de forma adecuada los valores experimentales en todo el intervalo de velocidades de agitación empleadas durante el crecimiento.

Asimismo, como puede observarse en la Figura 4.31, la tendencia que sigue η frente a N , que refleja un comportamiento análogo al observado en *P. putida* KTH2 (Figura 4.14): desde 100 hasta 600 rpm (zona a), los valores de η aumentan, y, a partir de 600 rpm, prácticamente su valor es constante (zona b). Además, como se puede apreciar en las Figuras 4.30 y Figura 4.31, las condiciones hidrodinámicas y/o de transporte de oxígeno que se establecen en la incubadora orbital, a 210 rpm (experimento Pw11), se corresponden también, con las del biorreactor trabajando entre 400 y 500 rpm, con crecimientos análogos y en condiciones limitantes de oxígeno.

Tabla 4.35 - Valores de la velocidad específica de crecimiento, μ , proporcionada por el ajuste del modelo cinético compuesto.

Exp.	μ (h ⁻¹)	Δ	SRC	F de Fisher	
				Obtenido	Tabulado (95%)
Pw1	0,092	± 0,001	0,001	5161	2,147
Pw2	0,135	± 0,001	0,001	13093	2,163
Pw3	0,217	± 0,002	0,002	10612	2,163
Pw4	0,249	± 0,004	0,002	3454	2,224
Pw5	0,469	± 0,009	0,005	2796	2,271
Pw6	0,483	± 0,011	0,005	1617	2,353
Pw7	0,526	± 0,008	0,005	3634	2,318
Pw8	0,532	± 0,011	0,005	1673	2,353
Pw9	0,537	± 0,008	0,005	3085	2,353
Pw10	0,558	± 0,009	0,005	2554	2,317

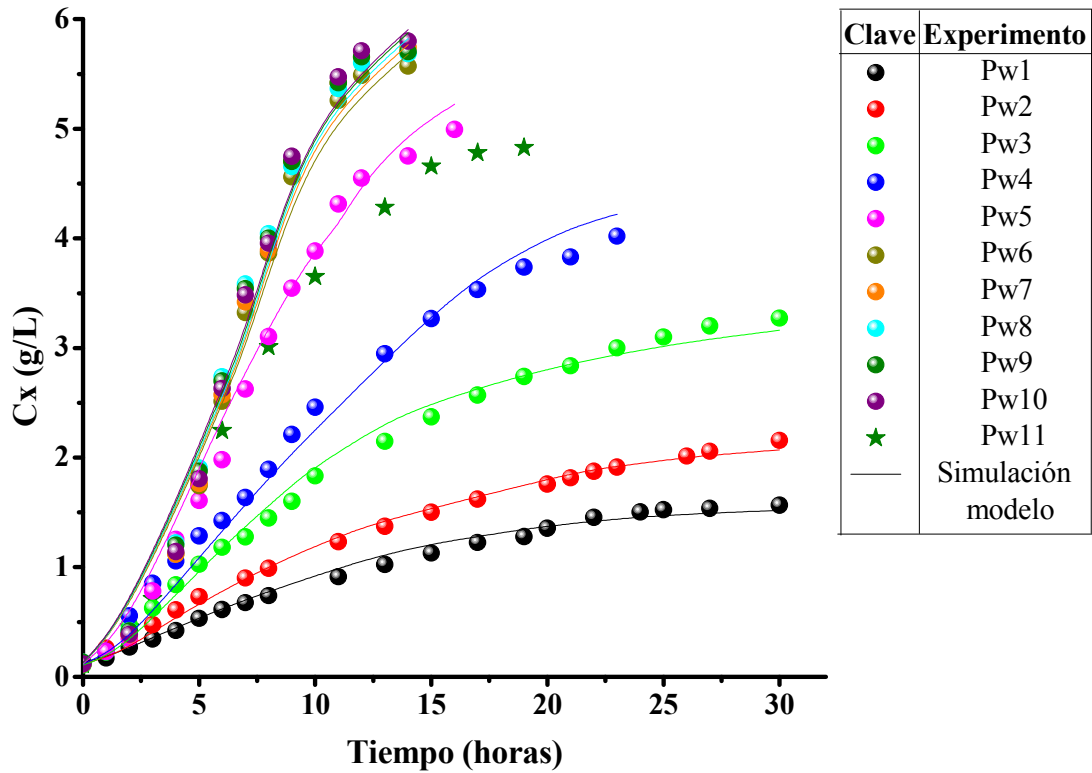
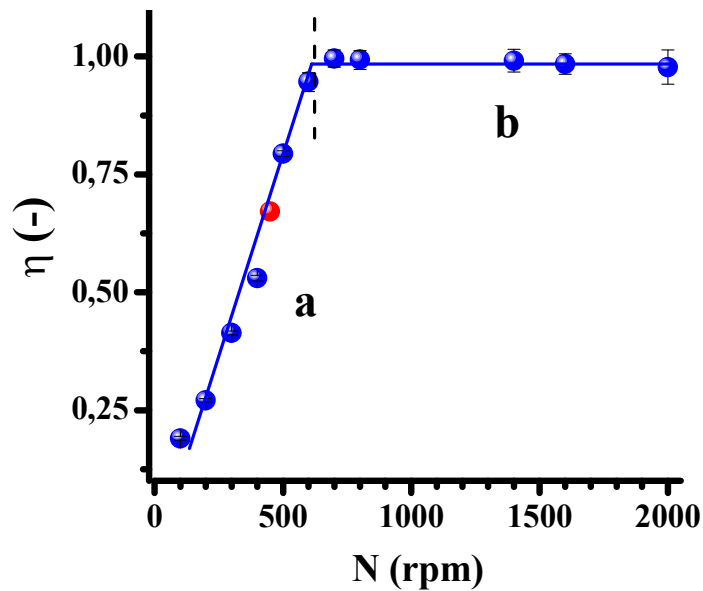


Figura 4.30 - Datos experimentales (●) y simulados empleando la Ec. [4.3] (—) del cultivo de *P. putida* natural bajo distintas velocidades de agitación.



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

Figura 4.31 - Influencia de la velocidad de agitación sobre el factor de efectividad para el crecimiento, η , en cultivos de *P. putida* natural. (●) Experimentos Pw1 a Pw10 y (●) experimento Pw11.

4.2.3. Análisis de la velocidad de consumo de oxígeno

A la vista de los resultados mostrados anteriormente, se pone de manifiesto que, velocidades de agitación inferiores a 600 rpm, establecen un ambiente microaerobio en el cultivo de *P. putida* natural, donde el transporte de oxígeno resulta ser la etapa controlante del proceso de crecimiento. En consecuencia, para evidenciar la relación entre las velocidades de transporte y de consumo de oxígeno y su efecto en el crecimiento, se ha realizado un estudio de ambos fenómenos.

Debido a los factores acreditados en el estudio de *P. putida* KTH2, para el caso de los cultivos de *P. putida* natural, se ha analizado la velocidad de consumo de oxígeno de acuerdo a lo descrito en el Apartado 2.3.1.6 de la presente Memoria (Santos y col., 2006). En cuanto a la estimación de $k_L a$, se ha seguido el procedimiento detallado en el Apartado 2.4.1 del Capítulo de Materiales y Métodos de la presente Memoria. Desde la Tabla 4.36 a la 4.38 se presentan los resultados obtenidos de la evolución de $k_L a$ y de OUR a lo largo del crecimiento, para las distintas velocidades de agitación y un caudal de aire constante de 2 L/min.

Tabla 4.36 - Datos experimentales de la OUR en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo para los experimentos Pw1 a Pw4.

Experimento Pw1			Experimento Pw2			Experimento Pw3			Experimento Pw4		
Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^4$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁷ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^3$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁶ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁶ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁶ (mol/L · s)
0,14	8,355	0,452	0,19	5,129	0,242	0,18	1,518	0,807	0,12	3,364	1,405
0,15	8,291	0,775	0,22	5,056	0,503	0,28	1,465	1,843	0,27	3,186	2,723
0,19	8,071	1,581	0,25	4,993	0,681	0,37	1,429	2,856	0,41	3,092	4,073
0,27	7,680	1,835	0,27	4,938	0,843	0,63	1,369	3,353	0,49	3,052	5,334
0,34	7,427	1,826	0,30	4,899	0,981	0,84	1,336	3,272	0,54	3,029	6,17
0,42	7,224	1,777	0,33	4,846	1,155	1,03	1,313	3,225	0,68	2,982	7,212
0,53	7,002	1,728	0,47	4,669	1,15	1,18	1,298	3,186	0,81	2,944	7,114
0,61	6,867	1,68	0,61	4,546	1,118	1,27	1,289	3,167	1,29	2,848	6,996
0,67	6,781	1,665	0,73	4,462	1,092	1,45	1,276	3,132	1,43	2,772	6,937
0,74	6,697	1,643	0,90	4,367	1,073	1,60	1,265	3,107	1,89	2,719	6,794
0,91	6,511	1,603	0,99	4,324	1,065	1,83	1,251	3,064	2,48	2,683	6,669
1,03	6,409	1,571	1,23	4,228	1,046	2,15	1,234	3,025	2,99	2,666	6,576
1,13	6,326	1,555	1,37	4,182	1,024	2,37	1,224	3,007	3,28	2,646	6,536
1,28	6,221	1,526	1,50	4,143	1,022	2,57	1,216	2,984	3,63	2,637	6,487
1,36	6,171	1,514	1,62	4,111	1,016	2,74	1,209	2,962	3,86	3,364	6,463
1,46	6,112	1,507	1,76	4,076	1,004	2,84	1,206	2,957	3,93	2,631	6,115
1,52	6,075	1,498	1,87	4,049	0,993	3,00	1,200	2,948	4,02	3,627	5,426
1,57	6,052	1,483	2,01	4,019	0,982	3,10	1,197	2,933			
			2,16	3,991	0,987	3,27	1,191	2,924			

Tabla 4.37 - Datos experimentales de la OUR en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo para los experimentos Pw5 a Pw8.

Experimento Pw5			Experimento Pw6			Experimento Pw7			Experimento Pw8		
Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^2$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)
0,23	5,842	0,164	0,17	9,667	0,126	0,16	2,084	0,058	0,17	3,005	0,152
0,35	5,699	0,503	0,23	9,530	0,264	0,21	2,061	0,116	0,23	2,993	0,365
0,48	5,591	0,723	0,33	9,343	0,592	0,32	2,027	0,728	0,35	2,975	0,8122
0,78	5,429	1,101	0,65	9,020	1,083	0,59	1,980	1,293	0,67	2,948	1,445
1,61	5,200	1,275	1,08	8,784	1,643	1,12	1,932	2,214	1,22	2,923	2,336
1,98	5,135	1,266	1,84	8,545	2,161	1,76	1,898	2,934	1,91	2,904	3,168
3,10	4,999	1,222	2,61	8,391	2,366	2,12	1,885	3,182	2,74	2,889	3,452
3,55	4,959	1,217	3,36	8,281	2,377	2,83	1,864	3,361	3,58	2,878	3,474
4,31	4,901	1,204	3,91	8,216	2,084	3,42	1,850	3,366	4,06	2,873	2,912
4,55	4,885	1,202	4,36	8,170	1,562	3,89	1,841	2,984	4,65	2,868	2,156
4,70	4,876	1,131	4,69	8,139	1,203	4,93	1,824	1,525	5,28	2,863	0,993
4,80	4,869	1,036	5,29	8,088	0,434	5,65	1,815	0,362	5,60	2,860	0,326
4,90	4,863	0,885	5,57	8,066	0,048	5,74	1,814	0,021	5,69	2,860	0,072
4,99	4,858	0,752									

Tabla 4.38 - Datos experimentales de la OUR en función de la concentración celular bajo distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo para los experimentos Pw9 y Pw10.

Experimento Pw9			Experimento Pw10		
Cx (g/L)	$k_L a \cdot 10^1$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)	Cx (g/L)	$k_L a$ (s ⁻¹)	OUR · 10 ⁵ (mol/L · s)
0,17	7,526	0,117	0,16	1,957	0,195
0,23	7,518	0,264	0,21	1,956	0,343
0,40	7,500	0,932	0,28	1,955	0,553
0,71	7,482	1,532	0,34	1,954	0,824
1,20	7,465	2,366	0,63	1,952	1,396
1,88	7,451	3,083	1,17	1,949	2,262
2,70	7,440	3,422	1,95	1,947	3,166
3,44	7,432	3,454	2,63	1,946	3,408
4,00	7,428	3,016	3,48	1,945	3,453
5,00	7,421	1,392	3,96	1,945	3,085
5,66	7,417	0,337	4,55	1,944	2,367
5,70	7,417	0,023	5,01	1,944	1,525
			5,71	1,943	0,455
			5,80	1,943	0,054

4.2.3.1. Discusión de los resultados

Como se aprecia en la Figura 4.32, la variación de OUR a lo largo del crecimiento muestra un comportamiento análogo al de la cepa KTH2 (Figura 4.15), aunque los cultivos de la cepa natural muestran una mayor velocidad de consumo.

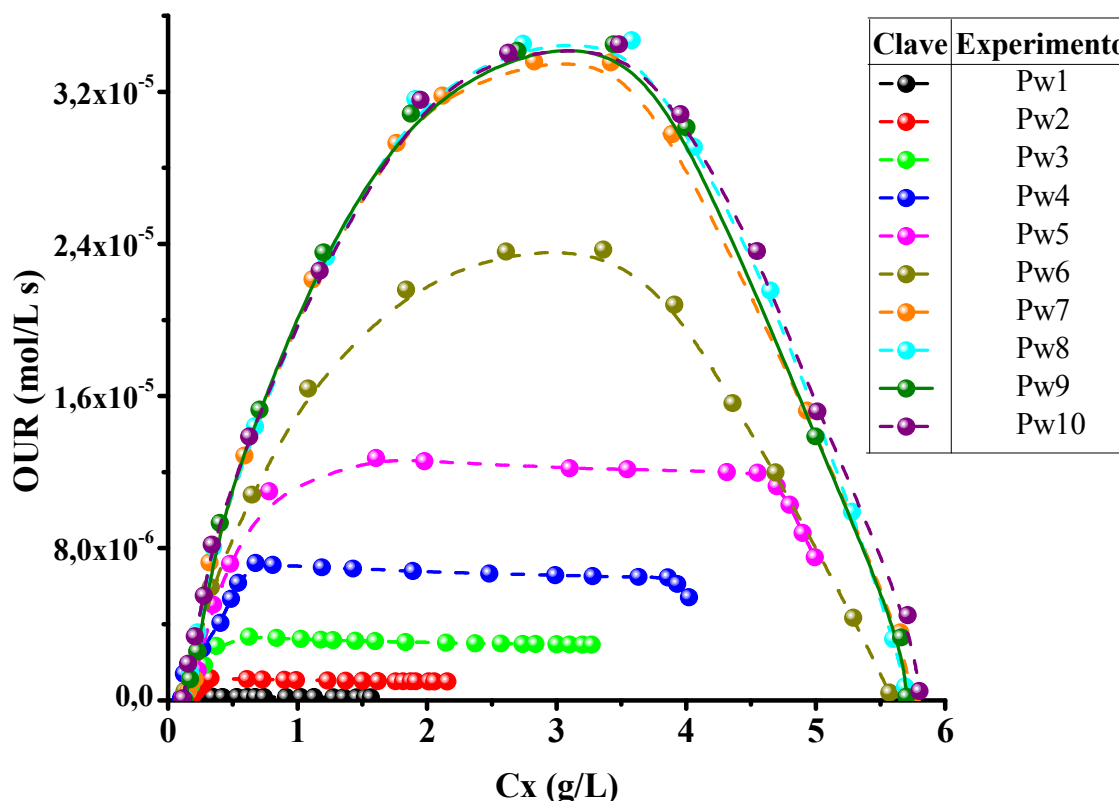


Figura 4.32 - Evolución de OUR con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo.

- Cálculo de la velocidad específica de consumo de oxígeno, q_{O_2}

Empleando los datos experimentales de OUR y de la concentración de biomasa se han determinado el consumo específico, q_{O_2} . En las Tablas 4.39 y 4.40 se da la evolución de q_{O_2} con la concentración celular, para las distintas velocidades de agitación. Los resultados se han representado, a su vez, en la Figura 4.33. Como se puede observar en dicha figura, la velocidad específica de consumo de oxígeno para los cultivos de la cepa natural muestra el mismo comportamiento que en el caso de la cepa KTH2. Sin embargo, esta última tiene una mayor velocidad específica de consumo de oxígeno.

Finalmente, para determinar los efectos que pueden ejercer las condiciones hidrodinámicas establecidas en el biorreactor sobre las células de la cepa natural, en la Figura 4.34 se ha representado cómo cambia con la agitación q_{O_2} , a un tiempo de crecimiento de 5 h. A partir del análisis de esta figura, puede afirmarse que, para el intervalo de agitaciones estudiado en esta Memoria (100 a 2000 rpm), no existe una condición de operación que determine un límite hidrodinámico del cultivo.

Asimismo, del análisis realizado se puede afirmar que el comportamiento del crecimiento de *P. putida* KTH2 no se debe a su condición de microorganismo modificado genéticamente, si no que parece un comportamiento propio de la especie *Pseudomonas putida*. Además, bajo condiciones hidrodinámicas no limitantes de oxígeno, la evolución del crecimiento y el consumo de oxígeno de ambas cepas se ajustan al comportamiento típico de la mayoría de los cultivos de microorganismos. Por el contrario, bajo las condiciones de operación en las que se establece un ambiente de microaerobiosis, ambas cepas muestran capacidad para crecer (probablemente activando rutas metabólicas distintas).

Tabla 4.39 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo para los experimentos Pw1 a Pw6.

Experimento Pw1		Experimento Pw2		Experimento Pw3		Experimento Pw4		Experimento Pw5		Experimento Pw6	
Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^7$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^5$ (mol/g · s)
0,19	8,53	0,33	3,52	0,37	7,62	0,54	11,38	0,48	14,96	0,33	1,80
0,17	6,98	0,47	2,45	0,63	5,34	0,81	8,80	1,61	7,92	0,65	1,66
0,27	6,83	0,61	1,83	0,84	3,90	1,29	5,88	1,98	6,35	1,08	1,52
0,34	5,29	0,73	1,50	1,03	3,14	1,89	3,59	2,62	4,71	3,36	0,71
0,42	4,20	0,90	1,19	1,18	2,69	2,48	2,68	3,10	3,95	3,91	0,53
0,53	3,23	0,99	1,07	1,27	2,48	2,99	2,20	4,31	2,78	4,36	0,36
0,61	2,74	1,23	0,84	1,45	2,16	3,28	1,99	4,55	2,63	4,69	0,26
0,67	2,46	1,37	0,75	1,60	1,94	3,63	1,78	4,70	2,40	5,29	0,08
0,74	2,22	1,50	0,68	1,83	1,67	3,82	1,69	4,80	2,14	5,57	0,01
0,91	1,75	1,62	0,62	2,15	1,41	3,86	1,67	4,90	1,79		
1,03	1,53	1,76	0,57	2,37	1,26	3,93	1,55	4,99	1,51		
1,13	1,37	1,87	0,53	2,57	1,16	4,02	1,35				
1,23	1,25	2,01	0,49	2,74	1,08						
1,28	1,19	2,16	0,45	2,84	1,04						
1,36	1,11			3,00	0,98						
1,46	1,03			3,10	0,95						
1,54	0,97										
1,57	0,95										

Tabla 4.40 - Valores de q_{O_2} a lo largo del crecimiento en función de la concentración celular, bajo distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo para los experimentos Pw7 a Pw10.

Experimento Pw7		Experimento Pw8		Experimento Pw9		Experimento Pw10	
Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^5$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^5$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^5$ (mol/g · s)	Cx (g/L)	$q_{O_2} \cdot 10^5$ (mol/g · s)
0,32	2,26	0,35	2,30	0,40	2,32	0,34	2,41
0,59	2,18	0,67	2,15	0,71	2,16	0,63	2,21
1,12	1,98	1,22	1,91	1,20	1,96	1,17	1,93
1,76	1,66	1,91	1,66	1,88	1,64	1,95	1,62
2,12	1,50	2,74	1,26	2,70	1,27	2,63	1,30
2,83	1,19	3,58	0,97	3,44	1,00	3,48	0,99
3,42	0,98	4,06	0,72	4,00	0,75	3,96	0,78
3,89	0,76	4,65	0,46	5,00	0,28	4,55	0,52
4,93	0,31	5,28	0,19	5,66	0,06	5,01	0,30
5,65	0,06	5,60	0,06	5,70	0,01	5,71	0,08
5,74	0,01	5,69	0,01			5,80	0,01

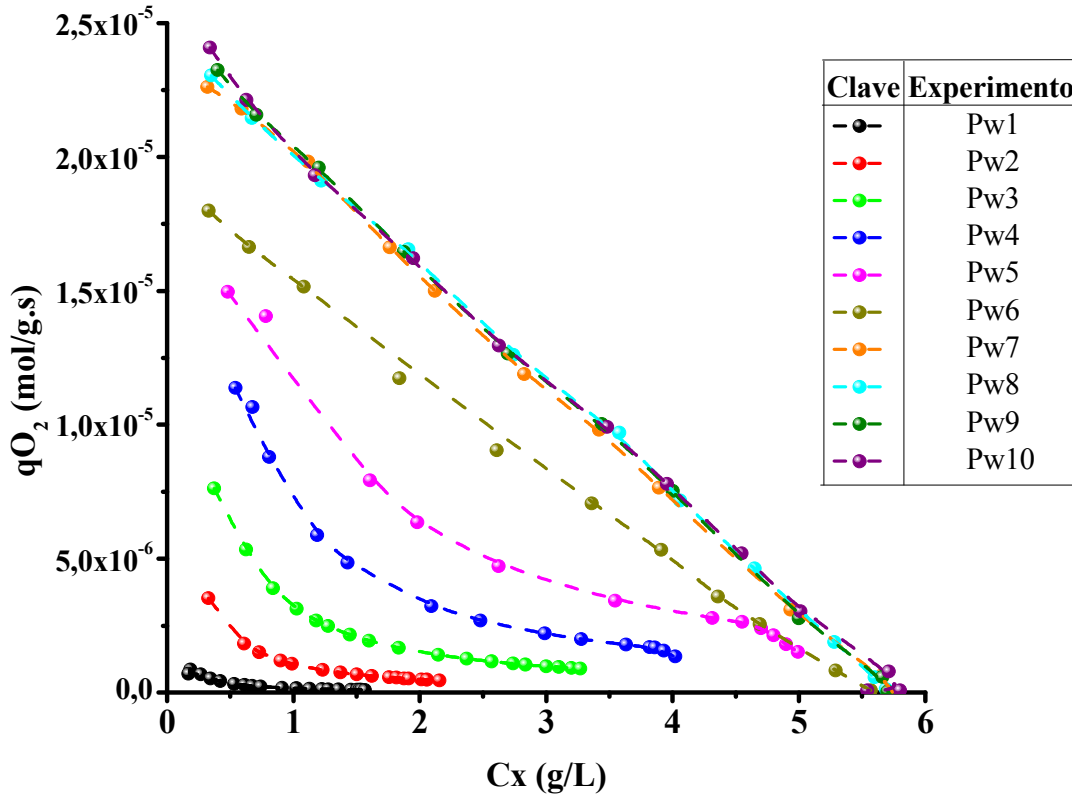


Figura 4.33 - Evolución de q_{O_2} con la concentración celular, a distintas velocidades de agitación en el medio de cultivo.

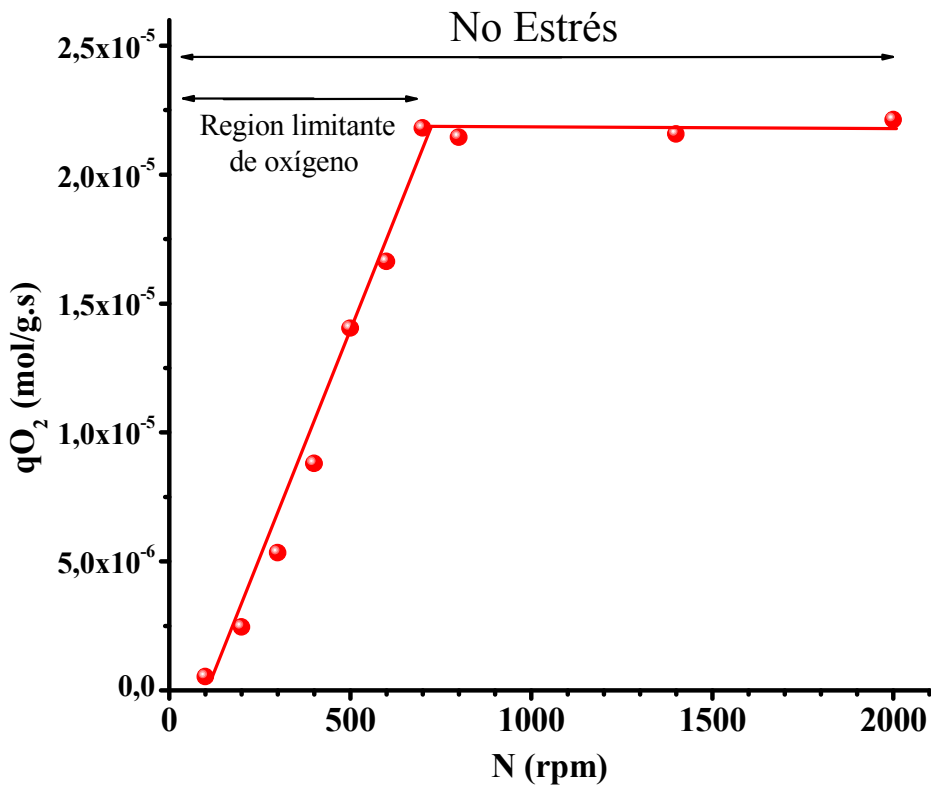


Figura 4.34 - Evolución de q_{O_2} con la velocidad de agitación. Células con un tiempo de crecimiento de 5 h.

4.3. BIBLIOGRAFIA

- Alcon, A.; Santos, V.E.; Martín, A.B.; Yustos, P. y García-Ochoa, F. 2005.** Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* **26**, 168-175.
- Atlas, R.M., 1994.** Petroleum microbiology. Macmillan Publishing, Nueva York (Estados Unidos).
- Çalik, P.; Yilgör, P.; Ayhan P. y Demir, A.S., 2004.** Oxygen effects on benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5075-5083.
- Çalik, P.; Yilgör, P. y Demir, A.S., 2006.** Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 617-627.
- Calzada, J.; Zamarro, M.T.; Alcon, A., Santos, V.E., Diaz, E., García J. y García-Ochoa, F., 2009a.** Analysis of Dibenzothiophene Desulfurization in a Recombinant *Pseudomonas putida* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 875-877
- Calzada, J.; Heras, S.; Alcon, A.; Santos, V.E. y García-Ochoa, F., 2009b.** Biodesulfurization of Dibenzothiophene (DBT) Using *Pseudomonas putida* CECT 5279: A Biocatalyst Formulation Comparison. *Energy Fuels.* **23**, 5491-5495.
- de Lorenzo, V. y Timmis, K.N., 1994.** Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived mini-transposons. *Methods Enzymol.* **35**, 386-405.
- García-Ochoa, F. y Gómez, E., 2005.** Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 771-772.
- García-Ochoa, F. y Gómez, E., 2009.** Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol. Adv.* **27**, 153-176.
- García-Ochoa, F.; Gómez, E.; Santos, V.E. 2000.** Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 680-690.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V.E., **2013**. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 911-925

Gomez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Martin, A.B. y Garcia-Ochoa, F., **2006a**. Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy fuels.* **20**, 1565-1571.

Gomez, E.; Santos, V.E.; Alcon, A.; Martin, A.B. y Garcia-Ochoa, F., **2006b**. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.

Inoue, A. y Horikoshi, K., 1991. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 194-196.

Leahy, J.G. y Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305-315.

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V.E. y Garcia-Ochoa, F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy Fuels.* **18**, 851-857

Martin, A.B.; Alcon, A.; Santos, V. y Garcia-Ochoa, F., **2005**. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* **19**, 775–782.

Nielsen, J.; Villadsen, J. y Liden, G., **2003**. *Bioreaction engineering principles*. Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York. 528.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005a**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005b**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **22**, 229-237.

Olmos, E; Mehmood, N; Haj Husein, L.; Goergen, J.; Fick, M. y Delaunay, S., **2013**. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of Streptomyces. Bioprocess Biosyst. Eng. **36**, 259-272.

Santos, V.E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gmez, E. y Garcia-Ochoa, F., **2006**. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. Biochem. Eng. J. **32**, 198-204.

Santos, V.E.; Alcon, A.; Martin, A.B.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F., **2007**. Desulfurization of dibenzothiophene using the 4S enzymatic route: Influence of operational conditions on initial reaction rates. Biocatal. Biotransform. **25**, 286-294.

Zou, X.; Xia, J. Y.; Chu, J.; Zhuang, Y. y Zhang S. L., **2012**. Real-time fluid dynamics investigation and physiological response for erythromycin fermentation scale-up from 50 L to 132 m³ fermenter. Bioprocess Biosyst. Eng. **35**, 789-800.

CAPÍTULO 5.
CAPACIDAD DESULFURANTE y
CONDICIONES FLUIDODINÁMICAS

CAPÍTULO 5

CAPACIDAD DESULFURANTE Y CONDICIONES FLUIDODINÁMICAS

En trabajos previos, el desarrollo del proceso de biodesulfuración comenzó con el estudio del crecimiento para la determinación de las mejores condiciones para la obtención del biocatalizador, etapa en la que se debe desarrollar la capacidad desulfurante del microorganismo. Para ello, se desarrolló un protocolo de trabajo en el que se optimizó la producción del inóculo y la composición del medio de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 (Olmo y col., 2005a) y *P. putida* KTH2 (Martin y col., 2004). Posteriormente, se determinaron las condiciones de operación, estudiando el transporte y el consumo de oxígeno durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 (Martin y col., 2005 y Gomez y col., 2006a) y *P. putida* KTH2 (Olmo y col., 2005b y Gomez y col., 2006b), estableciéndose que la eficiencia del proceso de la BDS depende de un adecuado contacto gas-líquido, tanto durante el cultivo de las células como biocatalizadores (al ser microorganismos aerobios estrictos), como durante el proceso de biodesulfuración de DBT en *resting cells* (ya que durante la ruta 4S se necesita oxígeno para realizar las diferentes oxidaciones de los compuestos), donde, para ambos procesos de manera independiente, la concentración de oxígeno disuelto resulta ser un nutriente limitante, y la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) podría ser el paso que controla cada bioproceso. Asimismo, se observó que el rendimiento del proceso depende de la edad celular, que en el caso de los cultivos de *R. erythropolis* presenta un máximo a partir de las 24 y hasta las 30 h de crecimiento (Gomez y col., 2006a; Santos

y col., 2006), mientras en *P. putida* se presenta un máximo en la capacidad de biodesulfuración cuando se emplean células de aproximadamente 9 a 15 h de edad (Martin y col., 2004; Martin y col., 2005; Calzada y col., 2009).

Sin embargo, no se han encontrado precedentes en la literatura sobre la **influencia de la velocidad de agitación durante el crecimiento** en el desarrollo de esta capacidad desulfurante. Para llevar a cabo este estudio, el sistema biocatalítico empleado está formado por células viables (extraídas a distintos tiempos de crecimiento, es decir con diferentes edades), que se utilizan en estado de reposo para realizar la transformación de dibenzotiofeno (DBT) en 2-hidroxibifenilo (HBP) empleando la **técnica de *resting cells***. En todos los casos, se ha utilizado DBT como sustrato para la transformación y se ha realizado el seguimiento a lo largo del tiempo de todos los compuestos involucrados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂, HBPS y HBP) según la técnica cromatográfica descrita en el Capítulo 2 de la presente Memoria.

Dado que, en los trabajos previos comentados anteriormente, ya fue demostrada la importante **influencia de la edad celular** en el desarrollo de la capacidad desulfurante durante el crecimiento de estos microorganismos, en este trabajo se ha considerado acoplar dicha variable como objeto de estudio; es decir, se han empleado células obtenidas a diferentes horas de crecimiento celular para llevar a cabo la desulfuración de DBT. Así pues, para la obtención de datos experimentales, se han tomado células de diferentes edades celulares en los experimentos de crecimiento realizados bajo **diferentes velocidades de agitación** tanto para *R. erythropolis* IGTS8 como para *P. putida* KTH2.

De esta manera, el presente capítulo tiene como objetivo principal estudiar la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el **desarrollo de la capacidad desulfurante** durante el crecimiento de las bacterias *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 y *Pseudomonas putida* KTH2.

5.1. CAPACIDAD DESULFURANTE de *R. erythropolis* IGTS8

Teniendo en cuenta que estudios previos (Gomez y col., 2006b; Santos y col., 2006), habían puesto de manifiesto que este microorganismo no desarrollaba capacidad desulfurante antes de las 16 h del crecimiento, como edades celulares representativas se han elegido 16, 24 y 30 h de crecimiento. Así, a las edades indicadas y para crecimientos realizados con diferentes agitaciones, se han extraído células y realizado los ensayos de BDS en *resting cells*. En la Figura 5.1 se esquematiza el procedimiento experimental seguido para realizar el estudio del desarrollo de la capacidad desulfurante de *R. erythropolis* IGTS8 durante el crecimiento realizado bajo diferentes condiciones de agitación, las mismas que las descritas en el Capítulo 3 de la presente Memoria.

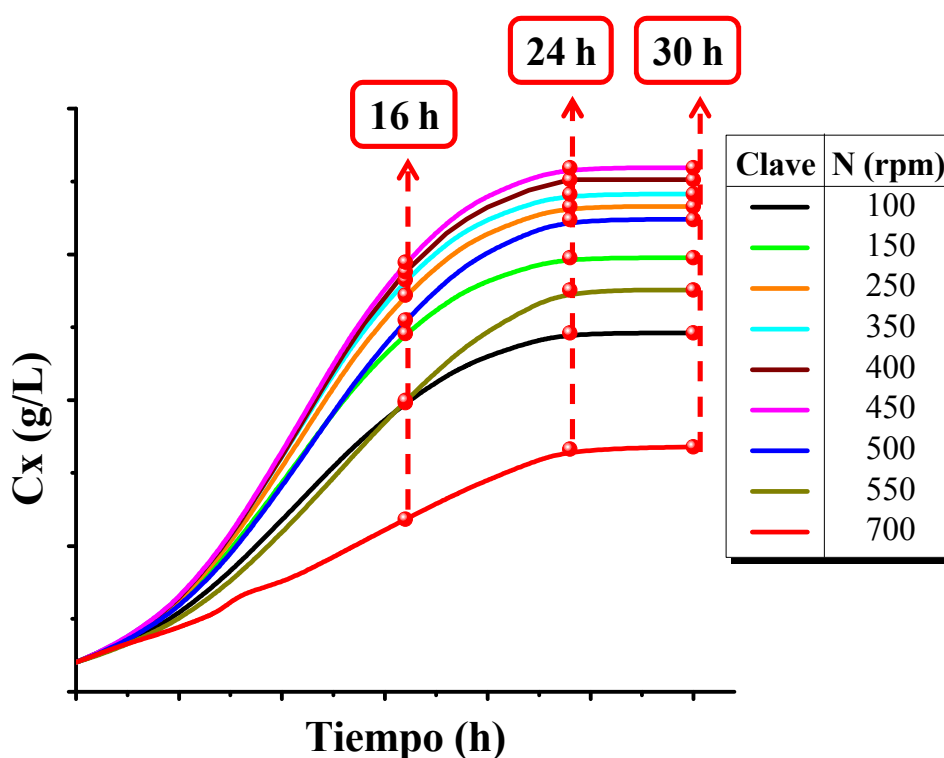


Figura 5.1 - Esquema que representa el procedimiento experimental seguido para el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el desarrollo de la capacidad desulfurante durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8.

5.1.1. Resultados experimentales

Para cada experimento se ha medido la concentración de los compuestos clave involucrados en la ruta 4S siguiendo el método de análisis descrito en el Apartado 2.3.2.3.

Es importante mencionar que, como se comprobó en un trabajo anterior (Iglesias, 2005), en el caldo de fermentación solo se detectan DBT y HBP; el resto de compuestos no se encuentran en el medio debido, probablemente, a la escasa permeabilidad de la membrana celular de *R. erythropolis* IGTS8 al DBTO₂ y al HBPS. Por esta razón, la concentración de los intermedios de la ruta 4S intra o extracelulares - DBTO, DBTO₂ y HBPS- se pueden determinar considerando la estequiometría del sistema, de acuerdo a la ecuación:

$$C_{Int/ext} = C_{DBT}^{t,0} - (C_{DBT}^t + C_{HBP}^t) \quad [5.1]$$

En las Figuras 5.2 a 5.10, correspondientes a las velocidades de agitación de 100, 150, 250, 350, 400, 450, 500, 550 y 700 rpm, respectivamente, se han representado los resultados experimentales de la evolución de la concentración de DBT y HBP durante los ensayos de *resting cells*, realizados con células obtenidas durante el crecimiento a las edades celulares de 16, 24 y 30 h.

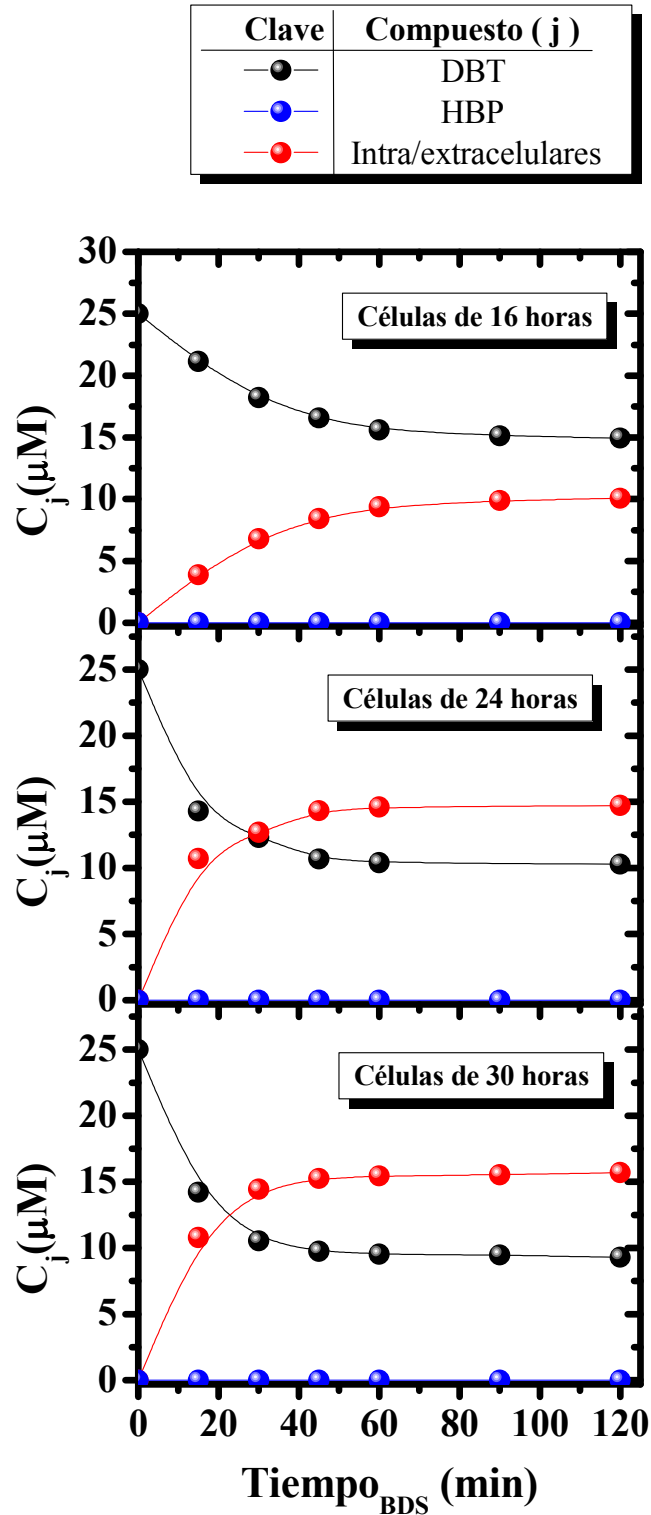


Figura 5.2 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 100 rpm.

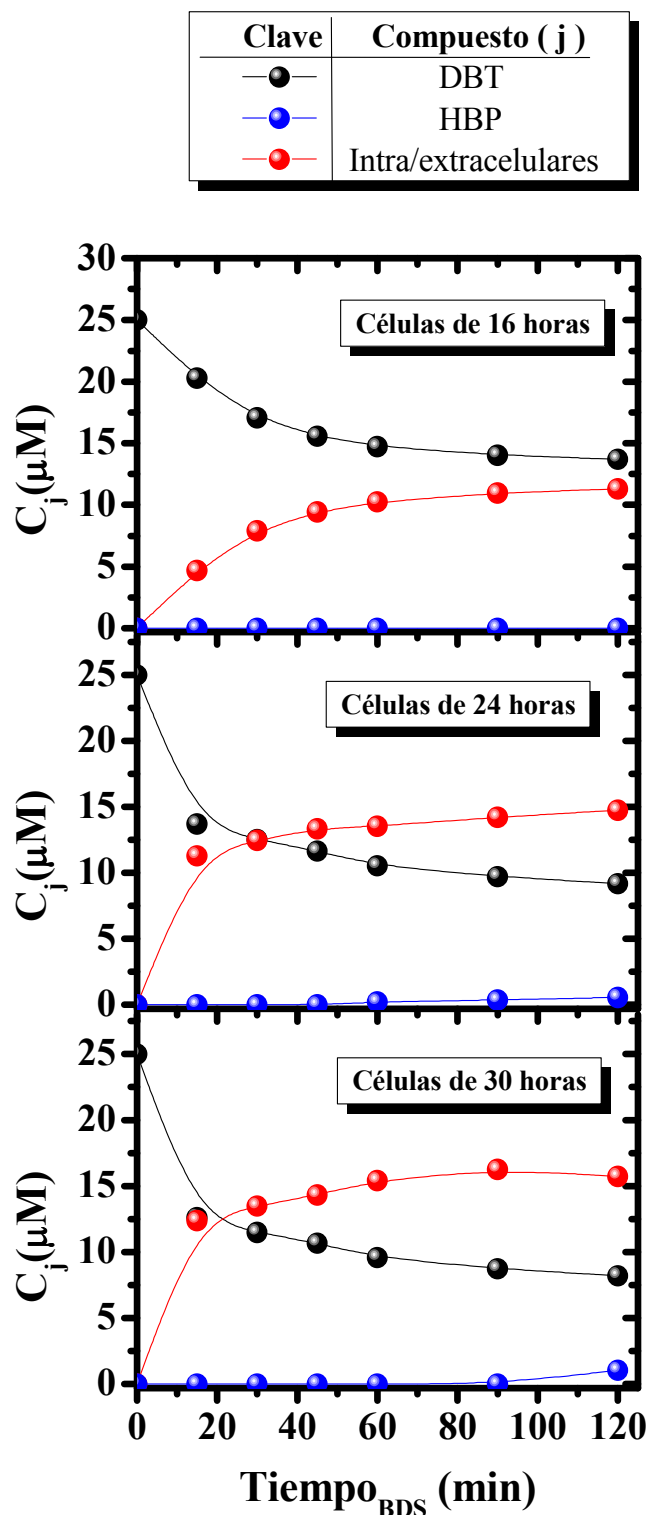


Figura 5.3 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 150 rpm.

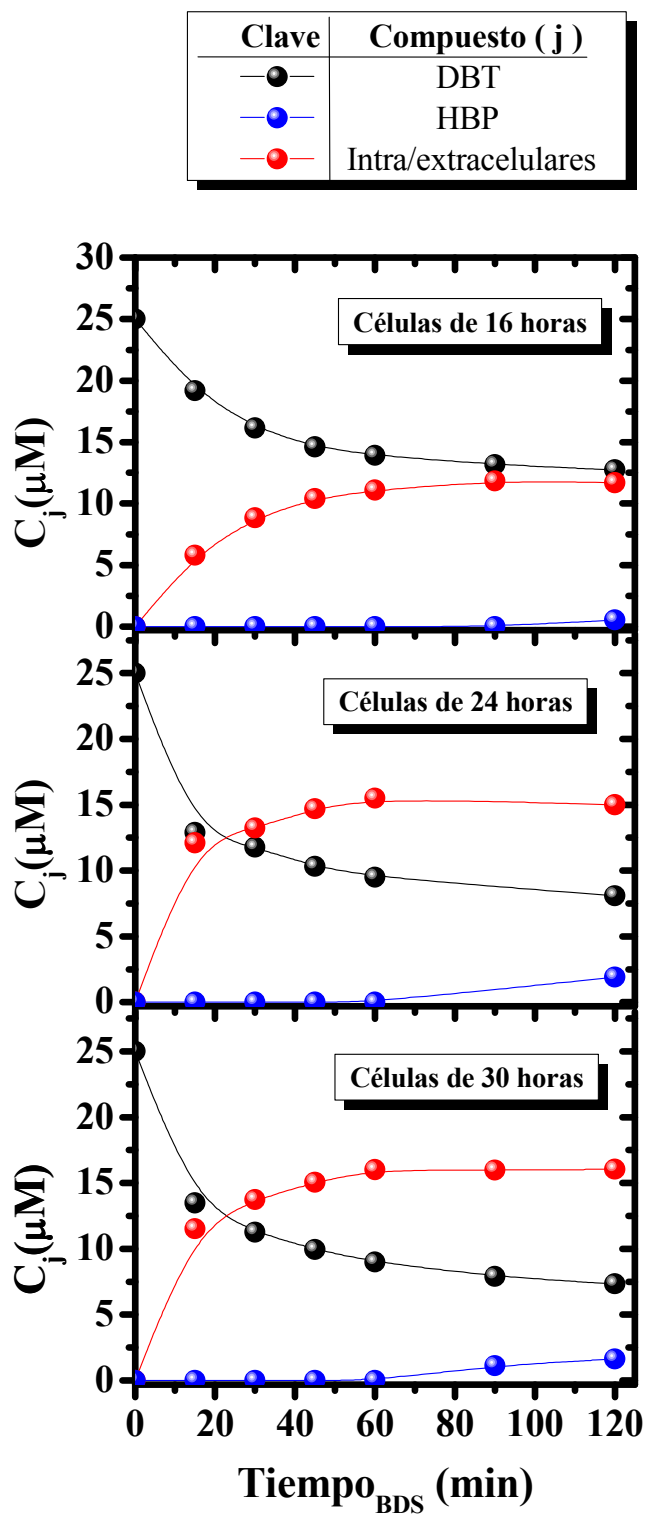


Figura 5.4 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 250 rpm.

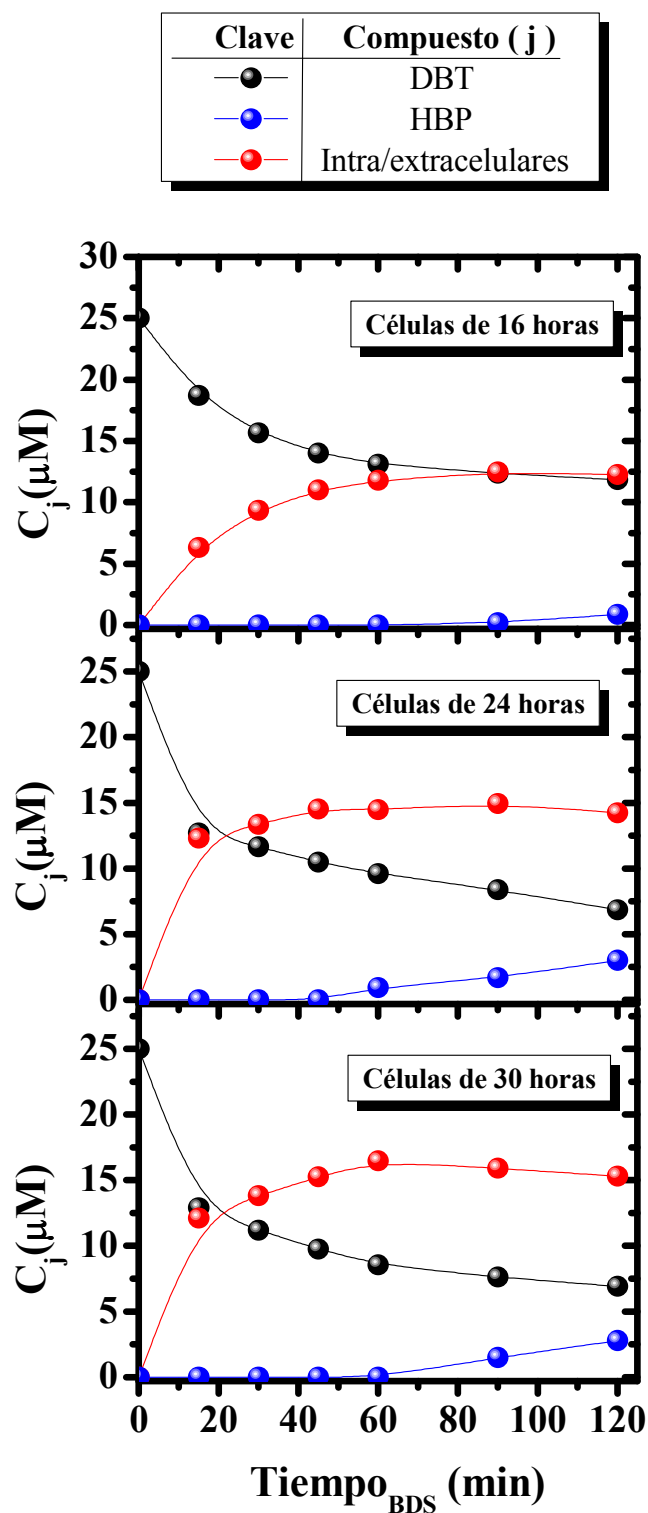


Figura 5.5 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 350 rpm.

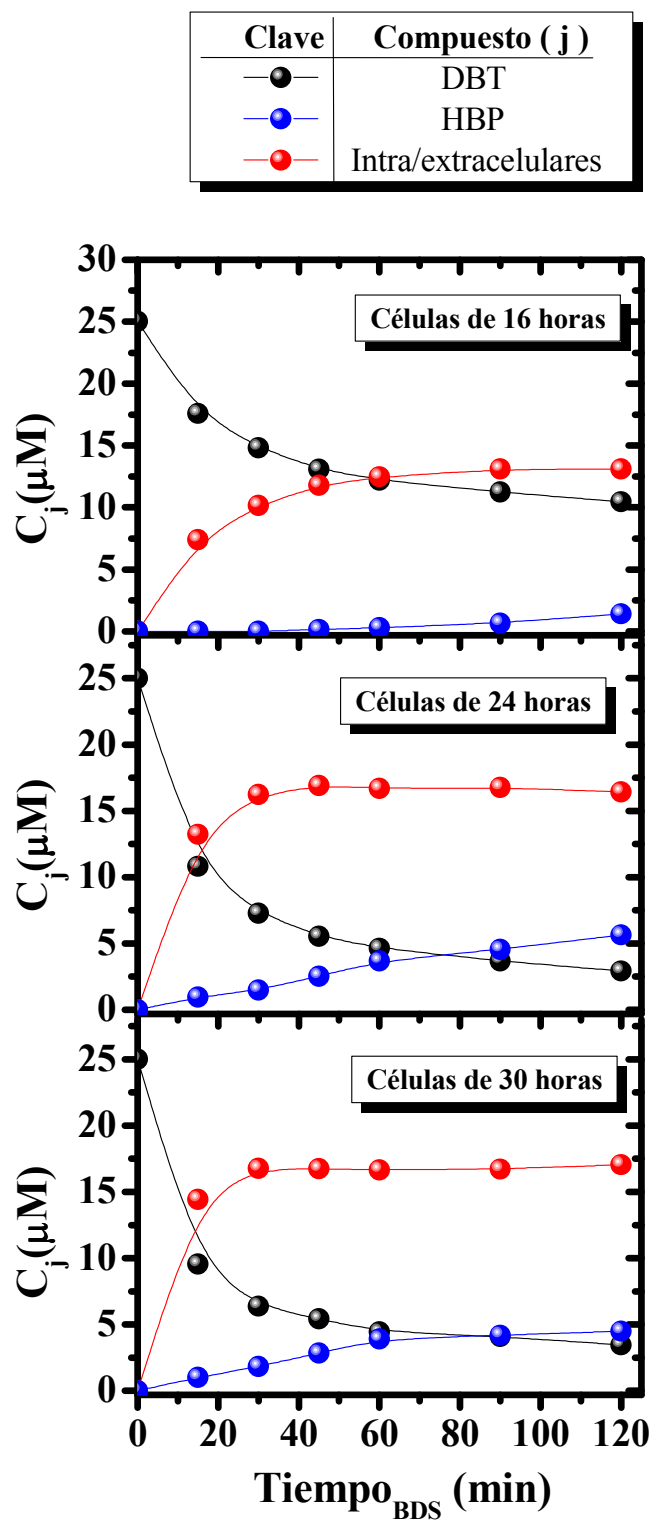


Figura 5.6 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 400 rpm.

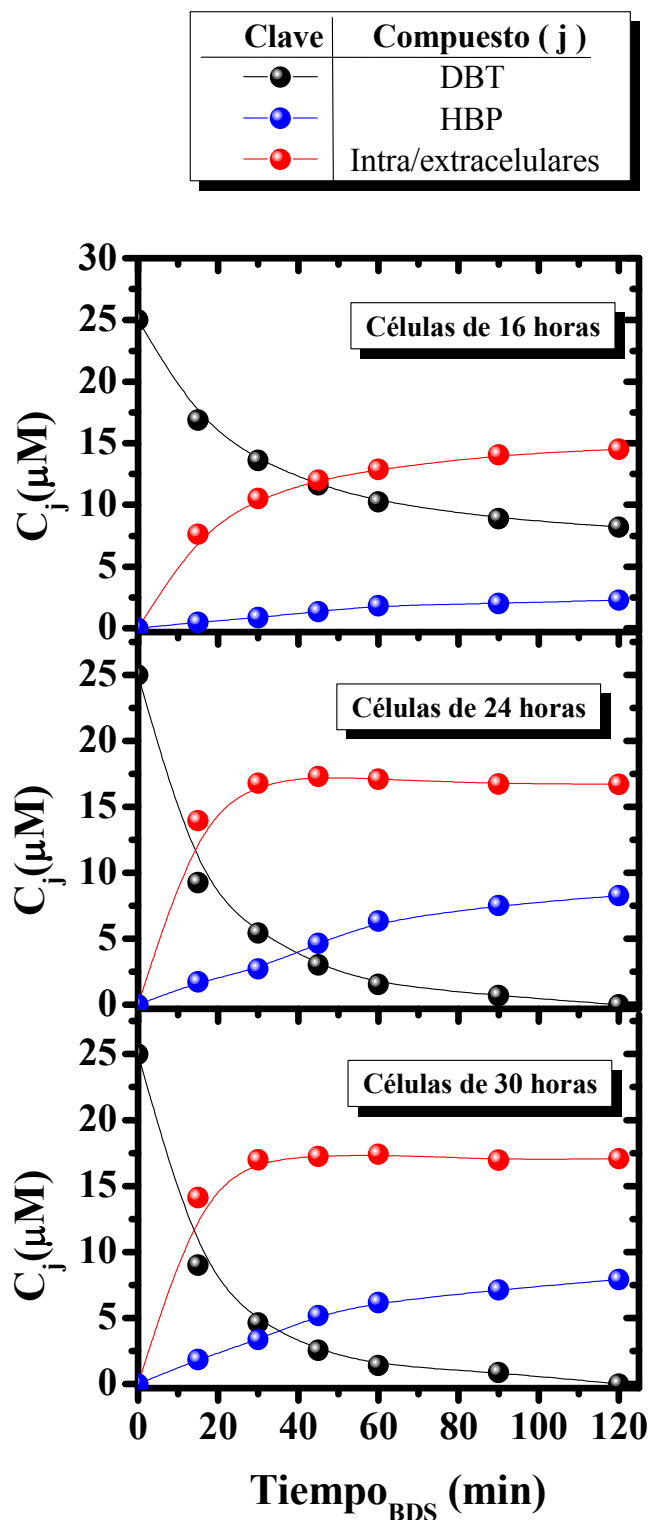


Figura 5.7 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 450 rpm.

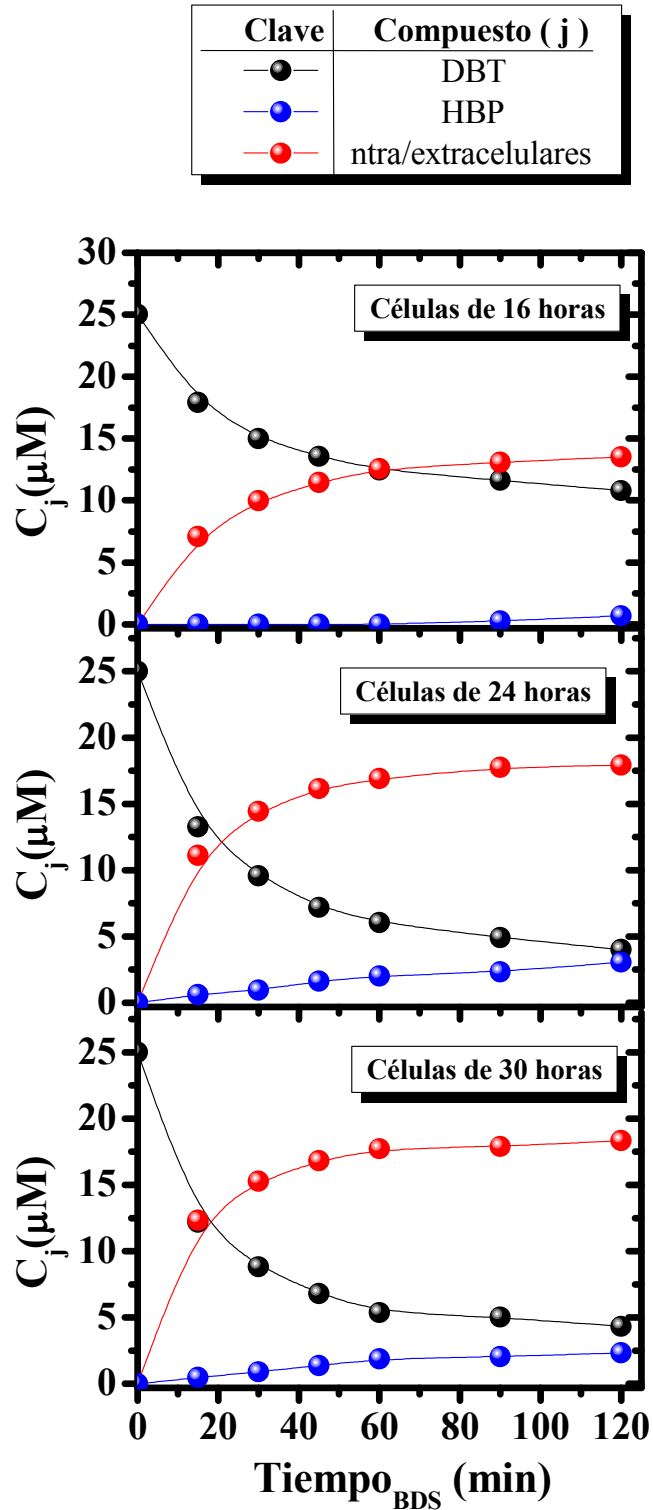


Figura 5.8 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 500 rpm.

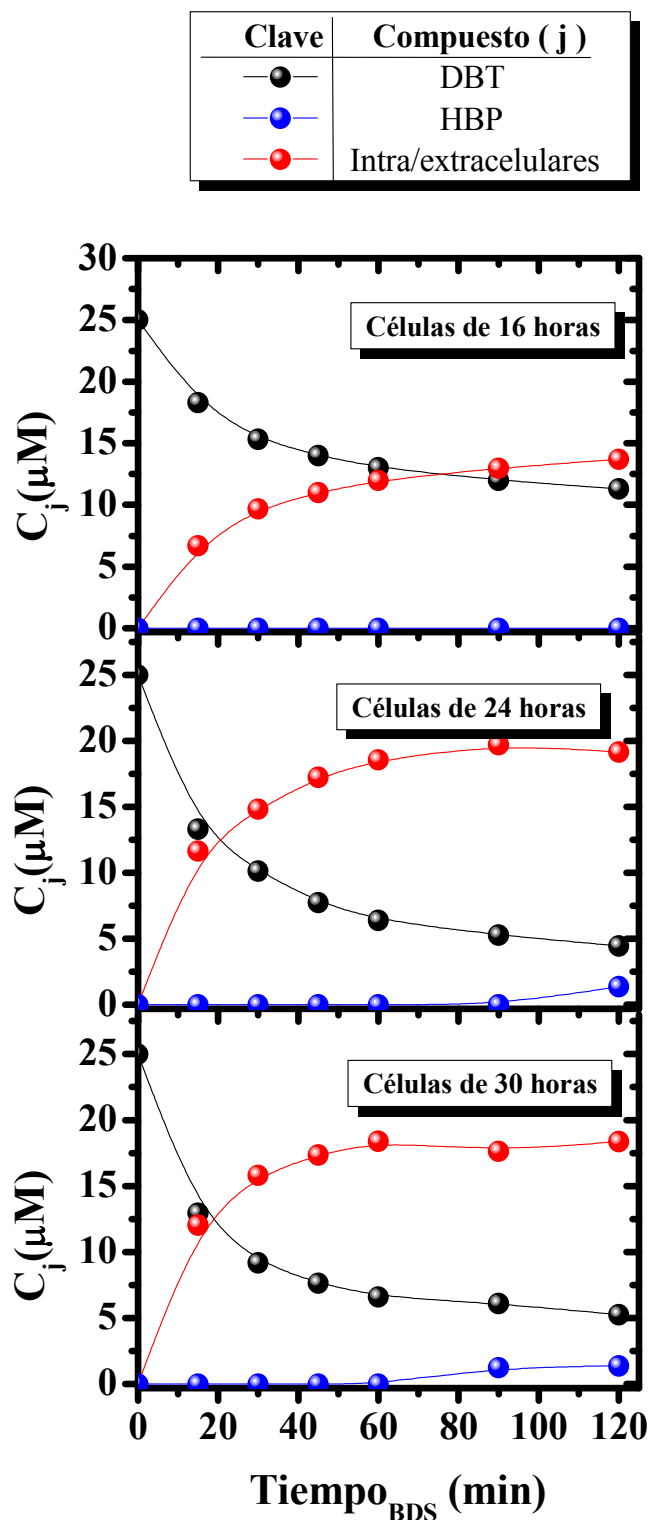


Figura 5.9 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 550 rpm.

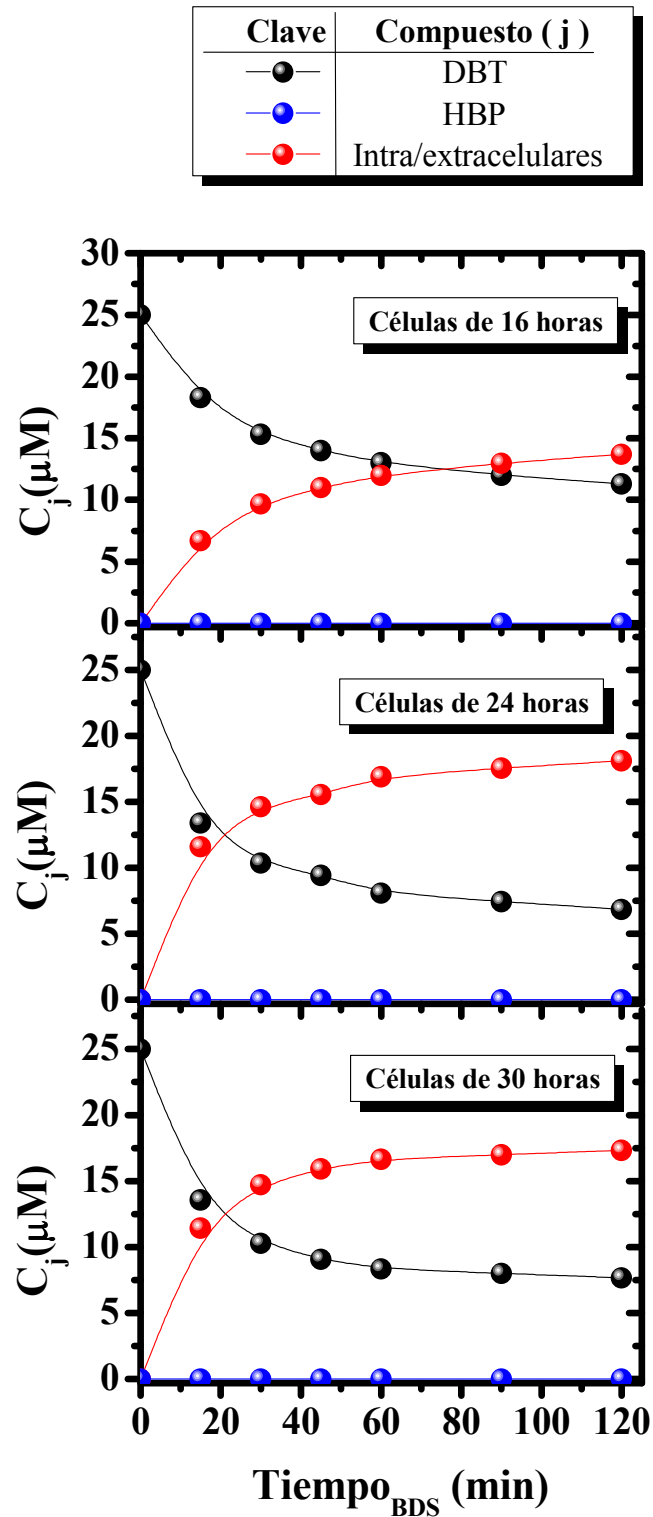


Figura 5.10 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intra/extracelulares de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 16, 24 y 30 h, obtenidas durante el crecimiento a 700 rpm.

5.1.2. Discusión de los resultados

En primer lugar, al analizar de forma independiente cada una de las figuras, se puede determinar la **influencia de la edad celular** en el desarrollo de la capacidad desulfurante. Así, para todas las agitaciones, los ensayos realizados con células obtenidas a las **16 h** del crecimiento presentan una menor concentración de HBP; es decir, una menor capacidad de desulfuración del compuesto DBT. Por el contrario, en los ensayos realizados con **células de 24 y 30 h** no hay diferencias significativas en las evoluciones de los compuestos de la ruta; sin embargo, se observa un mayor consumo de DBT y una mayor velocidad de aparición de HBP en comparación con aquellos realizados a las 16 h de crecimiento.

Al comparar los resultados de *resting cells* para una misma edad celular, pero de cultivos realizados a diferentes **velocidades de agitación**, se aprecian importantes diferencias. Así, conforme se mejoran las condiciones de transporte, esto es, cuando se aumenta la velocidad de agitación **desde 100 hasta 450 rpm**, se observa una mayor velocidad de consumo del sustrato DBT y, en consecuencia, una mayor desulfuración; es decir, una concentración más elevada del producto final, el HBP. Sin embargo, para velocidades de agitación superiores a dicho valor, hay una disminución del consumo del DBT y, por tanto, una menor concentración del compuesto final de la ruta HBP.

Para poder realizar un análisis cuantitativo de la capacidad desulfurante en las diferentes condiciones de agitación, se ha determinado el grado de conversión de DBT (X_{DBT}) y el rendimiento de DBT en HBP (X_{HBP}) de acuerdo a las relaciones:

$$X_{DBT} = \frac{C_{DBT}^{t,0} - C_{DBT}^t}{C_{DBT}^{t,0}} \cdot 100 \quad [5.2]$$

$$X_{HBP} = \frac{C_{HBP}^t}{C_{DBT}^{t,0}} \cdot 100 \quad [5.3]$$

Los valores de X_{DBT} y X_{HBP} para cada uno de los ensayos de *resting cell* se muestran en la Tabla 5.1. En la Figura 5.11, se han representado gráficamente en función de la velocidad de agitación. Como puede apreciarse, para todas las edades celulares estudiadas, se cumple que, al aumentar la velocidad de agitación desde 100 hasta 450 rpm, se produce un aumento del valor de los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} . Así, por ejemplo, a la edad celular 30 h, el parámetro X_{DBT} tiene un valor del 60 % a 100

Capacidad desulfurante y condiciones fluidodinámicas

rpm, alcanzando el 100 %, a 450 rpm. Además, la curva presenta, a la velocidad de agitación de 450 rpm, un máximo en los valores de X_{DBT} y X_{HBP} para las tres edades celulares. A velocidades de agitación superiores a este valor, los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} van disminuyendo progresivamente. Así, por ejemplo, para la edad celular de 30 h, el valor del parámetro X_{DBT} a 450 rpm, como ya se ha mencionado, es 100 % mientras que a 700 rpm, su valor es 70 %. Respecto al parámetro indicativo del grado de desulfuración X_{HBP} , pasa de un valor del 32 % a 450 rpm, a un valor de 0 % a 700 rpm.

Por todo lo comentado hasta este momento, se puede concluir que el aumento de la velocidad de agitación, desde 100 a 450 rpm, influye de forma positiva en el desarrollo de la capacidad desulfurante de las células durante su crecimiento. Sin embargo, el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 empleando velocidades de agitación por encima de 450 rpm, tiene un claro efecto negativo en el desarrollo de esta capacidad, seguramente por su efecto negativo sobre la concentración o actividad de las enzimas involucradas en la ruta 4S.

Tabla 5.1 - Valores de los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} calculados en los ensayos de BDS para cada velocidad de agitación y para cada edad de crecimiento, 16, 24 y 30 h.

N (rpm)	Células de 16 horas		Células de 24 horas		Células de 30 horas	
	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)
100	40,26	0,00	58,90	0,00	62,84	0,00
150	43,22	0,00	63,29	4,68	67,21	4,24
250	49,69	2,21	67,65	7,68	70,68	6,55
350	52,64	3,54	72,60	12,01	72,32	11,12
400	58,16	5,69	88,34	22,65	86,20	18,00
450	67,16	9,08	100,00	33,18	100,00	31,71
500	56,88	2,76	83,93	12,27	82,73	9,32
550	54,8	0,00	82,15	5,72	78,97	5,52
700	47,49	0,00	72,52	0,00	69,28	0,00

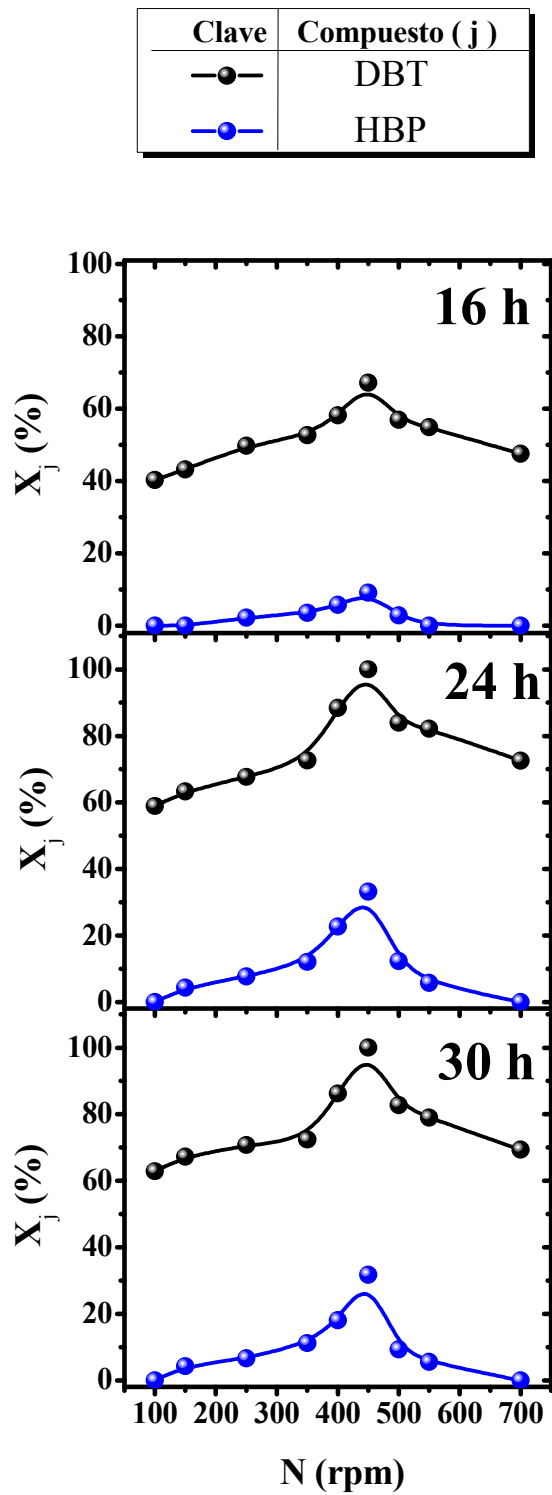


Figura 5.11 - Evolución de los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} en función de las condiciones hidrodinámicas estudiadas.

Para ultimar el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el desarrollo de la capacidad desulfurante de *R. erythropolis* IGTS8, se ha realizado una comparación entre la evolución de los parámetros relacionados con el crecimiento del microorganismo (obtenidos en el Capítulo 3 de esta Memoria) con los correspondientes a la biodesulfuración, obtenidos en el presente capítulo. Los parámetros de crecimiento utilizados para llevar a cabo esta comparación han sido la velocidad específica de crecimiento, μ , la concentración máxima de biomasa, C_X^{max} , y la velocidad específica de consumo de oxígeno, q_{O_2} ; mientras que los parámetros indicadores del grado de capacidad desulfurante han sido X_{DBT} y X_{HBP} . Es importante comentar que, dado que se habían obtenido valores de los parámetros de biodesulfuración para cada una de las edades celulares y para cada velocidad de agitación, ha sido necesario elegir una **edad representativa** de lo que está ocurriendo en el sistema. Para decidir cuál podría ser este tiempo de crecimiento, se ha establecido el criterio de aquella edad en la que las células se encuentran en un “**estado metabólico**” similar. Para ello, de la observación de la Figura 5.1, se consideró que lo que podría ser más fácilmente comparable entre los diferentes experimentos es el **inicio de la fase estacionaria de crecimiento**, coincidente para todos los experimentos de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 con las 24 h del proceso.

En la Tabla 5.2 se indican los valores de los parámetros de crecimiento y de biodesulfuración que han sido utilizados en esta comparación y en la Figura 5.12 se muestra su representación gráfica. Como se puede apreciar, la evolución de los valores de los parámetros del crecimiento coincide con la correspondiente a los valores de los parámetros de biodesulfuración. Así, a velocidades de agitación bajas, por ejemplo, desde 100 hasta 250 rpm, tanto el crecimiento como la biodesulfuración se ven afectadas por la escasa disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo y los parámetros presentan su valor más bajo. A partir de 350 y hasta 450 rpm, como consecuencia de una mejora en la mezcla y una mayor velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo, los valores de los parámetros se mantienen en un valor prácticamente constante, mientras que la capacidad desulfurante alcanza su valor máximo. Sin embargo, a partir de 450 rpm, a pesar de mejorar el transporte de oxígeno, las condiciones fluidodinámicas del biorreactor afectan a las células tanto en el crecimiento como en la capacidad de desulfurar, produciéndose una disminución de los valores de todos los parámetros.

Capacidad desulfurante y condiciones fluidodinámicas

Por tanto, del análisis de la Figura 5.12, se puede concluir que *R. erythropolis* IGTS8 sufre una situación de estrés cuando su crecimiento se lleva a cabo a velocidades de agitación superiores a 450 rpm, siendo éste un **valor crítico** tanto para el crecimiento, como para la biodesulfuración y el consumo de oxígeno.

Tabla 5.2 - Valores de los parámetros de crecimiento (q_{O_2} , μ y C_x^{max}) y de los parámetros de biodesulfuración X_{DBT} y X_{HBP} correspondientes a las 24 horas de crecimiento para cada velocidad de agitación.

N (rpm)	$q_{O_2} \cdot 10^7$ (mol/g · s)	μ (h ⁻¹)	C_x^{max} (g/L)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)
100	Nd	0,23	1,10	0,00	58,90
150	1,40	0,24	1,30	4,68	63,29
250	1,46	0,26	1,50	7,68	67,65
350	1,52	0,26	1,6	12,01	72,60
400	Nd	0,26	1,70	22,65	88,34
450	1,52	0,26	1,75	33,18	100,00
500	0,88	0,24	1,70	12,27	83,93
550	0,58	0,21	1,51	5,72	82,15
700	0,31	0,15	0,85	0,00	72,52

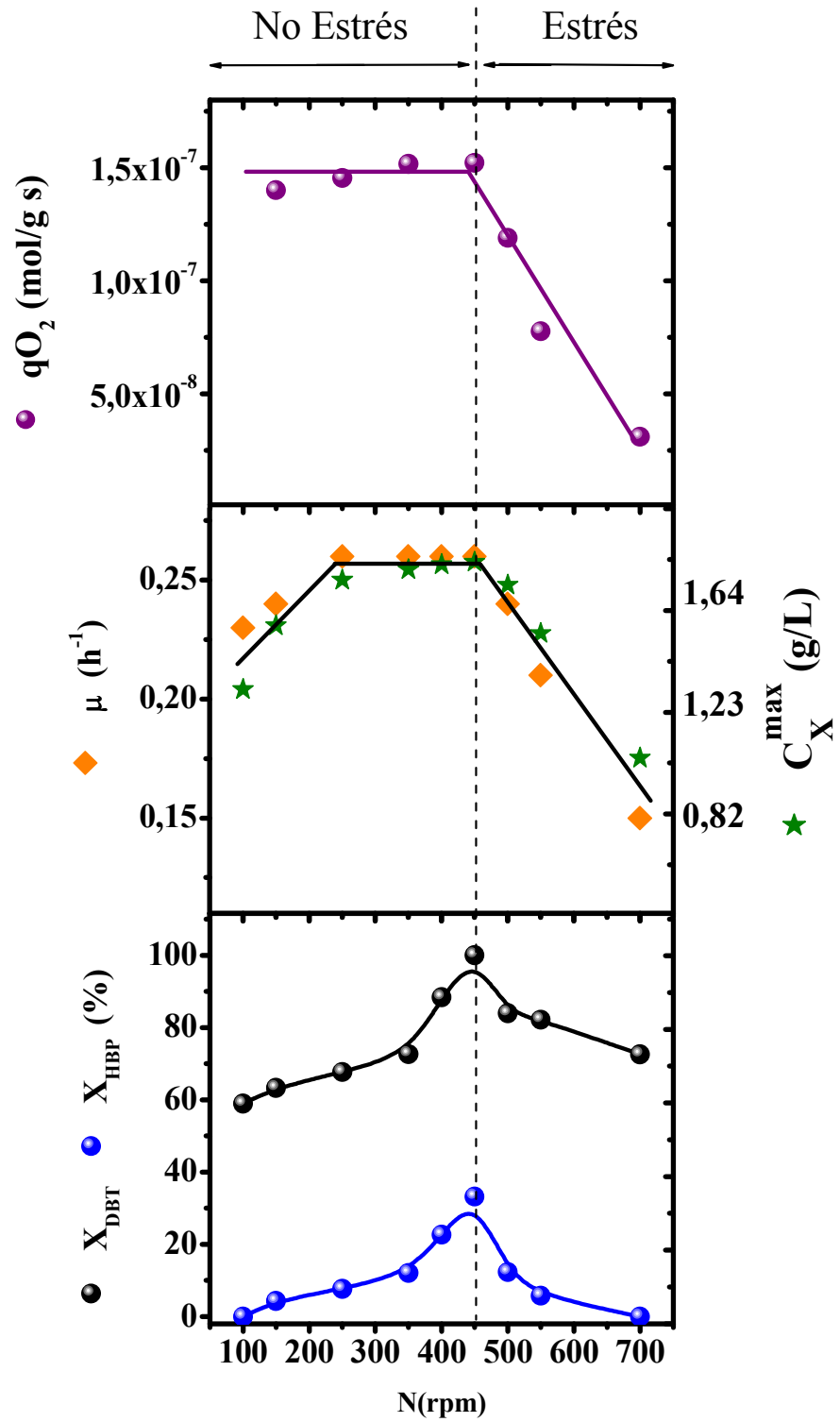


Figura 5.12 - Evolución de los Parámetros de crecimiento (q_{O_2} , μ y C_X^{max}) y de los parámetros de biodesulfuración X_{DBT} y X_{HBP} obtenidos para cada velocidad de agitación para la edad celular de 24 h.

5.2. CAPACIDAD DESULFURANTE de *Pseudomonas putida* KTH2

Al igual que en el caso anterior, en la Figura 5.13 se ha hecho una representación esquemática de las curvas de crecimiento y las horas de crecimiento celular a las que se han tomado las muestras para estudiar el desarrollo de la capacidad desulfurante de *P. putida* KTH2 mediante ensayos de *resting cells*.

Como se indica en la Figura 5.13, las **edades celulares** a las que se han tomado muestras para realizar los ensayos de BDS en todos los casos, excepto a 800 rpm, han sido **5, 15 y 23 h**. Para el crecimiento a 800 rpm, no ha sido posible obtener la muestra correspondiente a las 23 h ya que, a ese tiempo del proceso y en esas condiciones hidrodinámicas, el cultivo se haya en fase de muerte celular (datos no mostrados). Por esa razón, para 800 rpm, a fin de disponer también de tres edades celulares con las que poder observar la evolución de la capacidad desulfurante con el tiempo de crecimiento, se han tomado las horas **5, 10 y 15 h**.

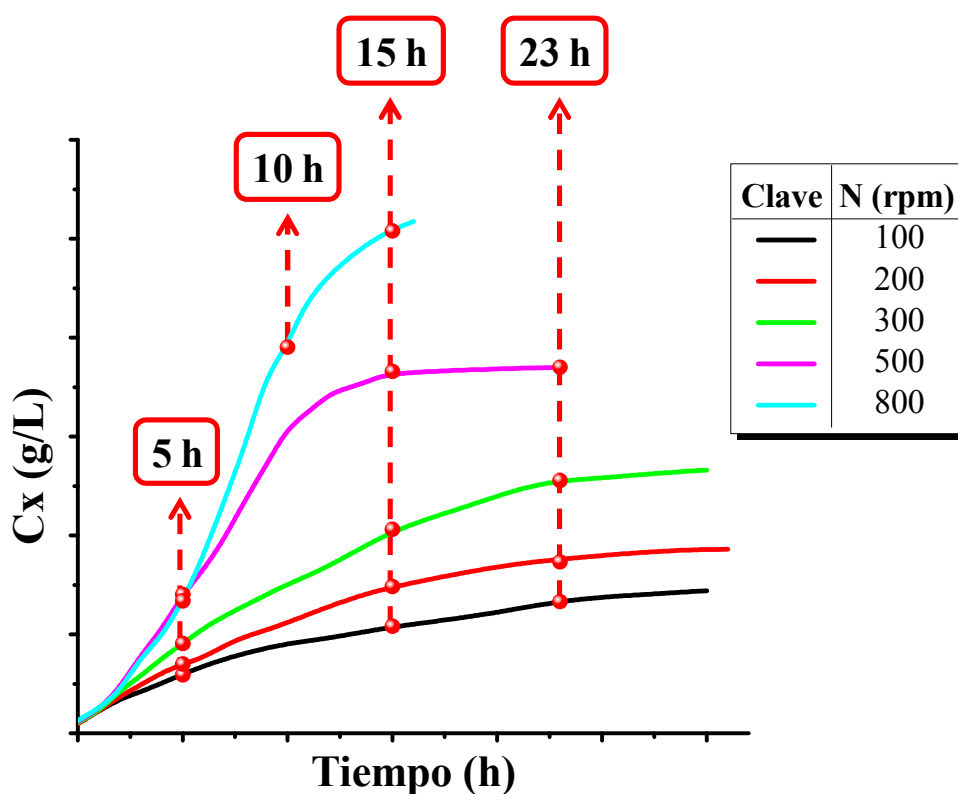


Figura 5.13 - Esquema que representa el procedimiento experimental seguido para el estudio de la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el desarrollo de la capacidad desulfurante durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTH2.

5.2.1. Resultados experimentales

Para cada experimento se ha medido la concentración de los compuestos clave involucrados en la ruta 4S (DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS y HBP) siguiendo el método de análisis descrito en el Apartado 2.3.2.3 de la presente Memoria.

Con respecto al seguimiento de los intermedios de la ruta (DBTO, DBTO₂ y HBPS), se van a presentar los resultados experimentales como la suma total de las concentraciones de estos tres compuestos.

Los resultados experimentales obtenidos se muestran en las Figura 5.14 a 5.18, correspondientes a las **velocidades de agitación de 100, 200, 300, 500 y 800 rpm**, respectivamente. En cada una de estas gráficas se ha representado la evolución de la concentración de los compuestos de la ruta 4S durante los ensayos de *resting cells* realizados con células obtenidas durante el crecimiento a las edades celulares especificadas anteriormente.

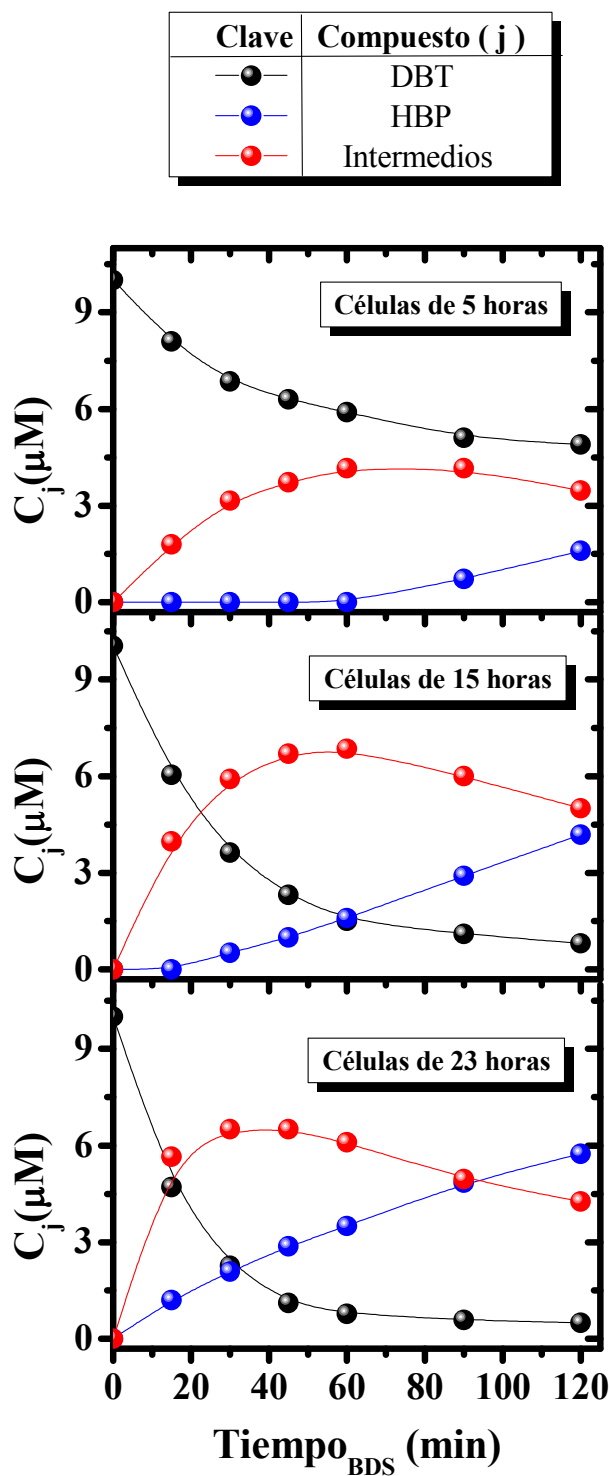


Figura 5.14 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intermedios de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 5,15 y 23 h, obtenidas durante el crecimiento a 100 rpm.

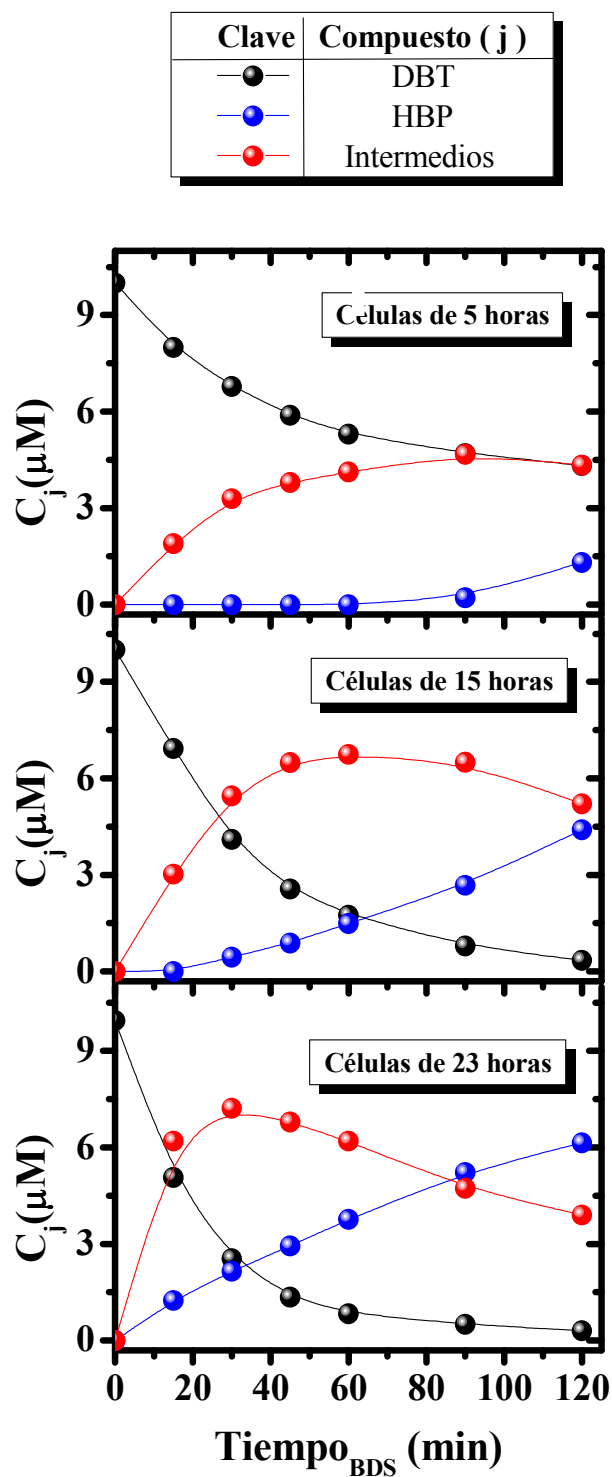


Figura 5.15 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intermedios de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 5, 15 y 23 h, obtenidas durante el crecimiento a 200 rpm.

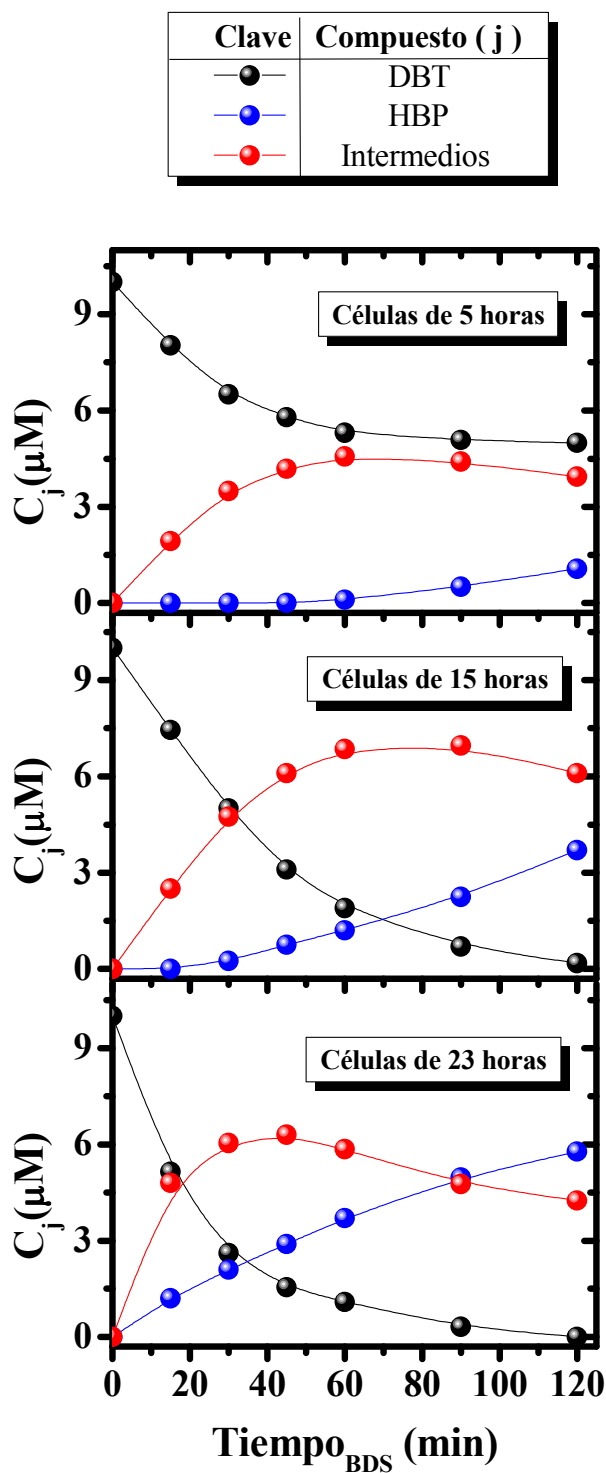


Figura 5.16 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intermedios de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 5, 15 y 23 h, obtenidas durante el crecimiento a 300 rpm.

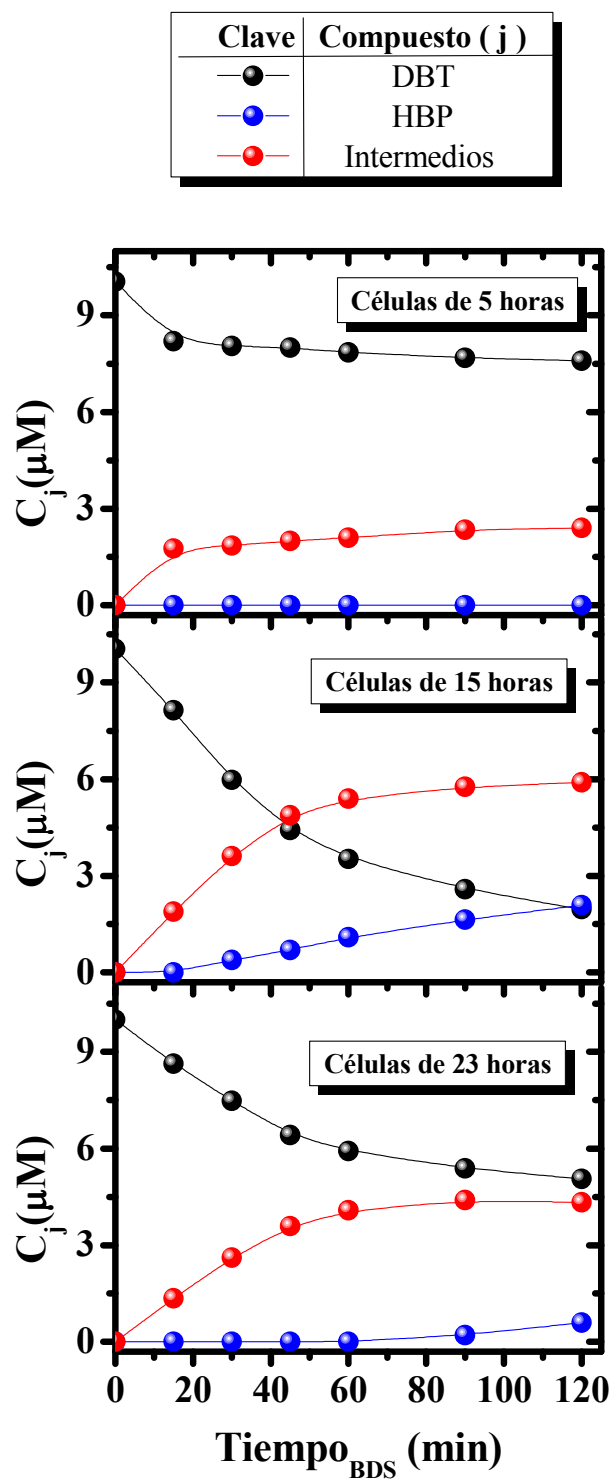


Figura 5.17 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intermedios de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 5, 15 y 23 h, obtenidas durante el crecimiento a 500 rpm.

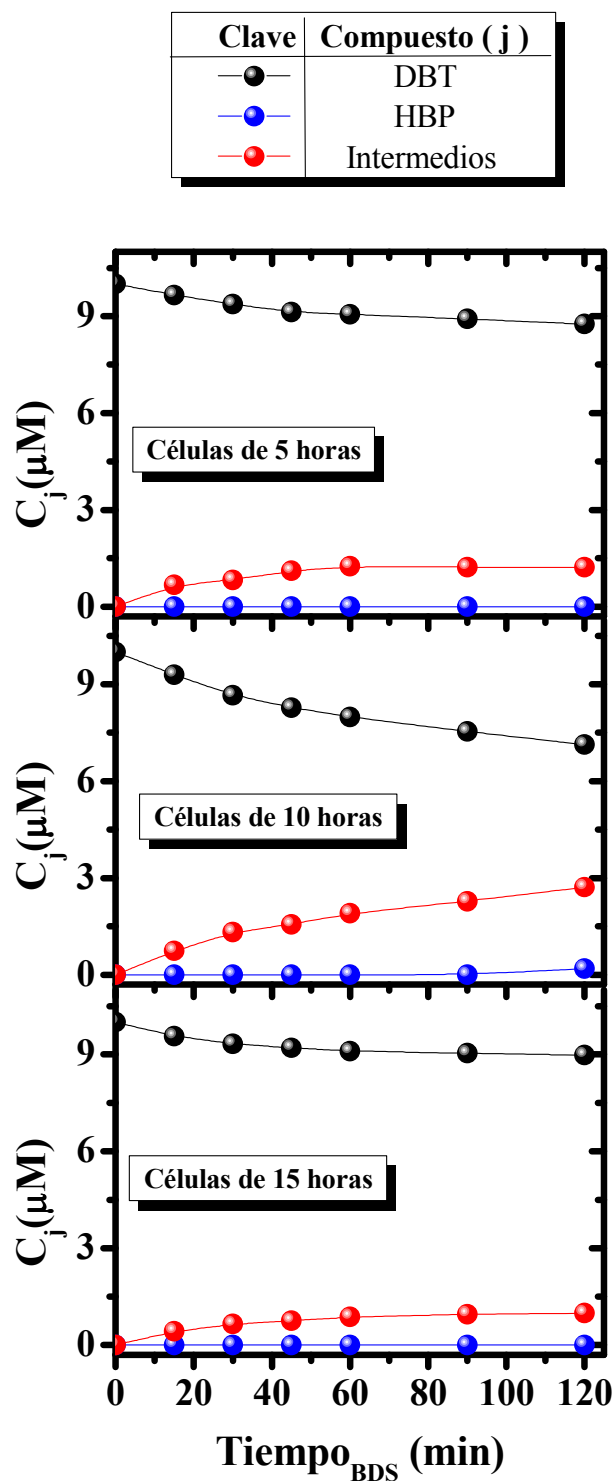


Figura 5.18 - Evolución de las concentraciones de DBT, HBP y de intermedios de la ruta durante los ensayos de resting cells empleando células de 5, 10 y 15 h, obtenidas durante el crecimiento a 800 rpm.

5.2.2. Discusión de los resultados

Del análisis de la influencia de la **edad celular** en los ensayos de BDS *resting cells*, se pone de manifiesto que, a bajas agitaciones (100, 200 y 300 rpm), en todos los casos, se produce una disminución de la concentración del sustrato DBT, a mayor velocidad cuanto más avanzada es la edad celular. Del mismo modo, la concentración final de HBP alcanzada al finalizar el tiempo del ensayo es mayor a las 23 h del crecimiento. Esta influencia de la edad celular no es igual para los experimentos realizados a velocidades de agitación más elevadas. Así, para 500 rpm, hay un aumento en el consumo de DBT y un incremento en la concentración final de HBP hasta las 15 h del crecimiento, mientras que en los ensayos realizados con células de 23 h, se aprecia un menor consumo de DBT y una menor concentración final de HBP. Para células cultivadas a 800 rpm, hasta las 10 h de tiempo de crecimiento, la biodesulfuración mejora con la edad celular, pero los resultados obtenidos para la edad celular de 15 h muestran una ralentización en el consumo de DBT y una menor concentración del producto final, HBP.

Al comparar la **influencia de la velocidad de agitación** se observa que, a velocidades de agitación bajas, desde 100 hasta 300 rpm, la capacidad que muestran las células para consumir el sustrato DBT y, a su vez, para desulfurar dicho sustrato hasta el producto final HBP es muy similar. Sin embargo, a velocidades de agitación más altas, 500 y 800 rpm, se observa que el consumo de DBT se ralentiza, y la conversión de DBT en HBP disminuye.

Las influencias descritas se pueden observar de una forma más clara comparando los **parámetros de la biodesulfuración** (X_{DBT} y X_{HBP}), ya definidos anteriormente. Los valores de los parámetros calculados para cada uno de los ensayos de *resting cell* realizados con *P. putida* KTH2 se muestran en la Tabla 5.3 y su representación gráfica en la Figura 5.19.

Como se puede observar en dicha figura, la evolución de los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} , es similar para cada edad en el intervalo de velocidades de agitación entre 100 y 300 rpm. Sin embargo, y como ya se ha comentado anteriormente, la edad celular en este intervalo de agitación tiene una influencia importante en el valor de los parámetros. Así el parámetro X_{DBT} tiene un valor en torno al 50 % en los ensayos realizados con

células de 5 h y del 100 % con células de 23 h de edad. En cuanto al parámetro X_{HBP} , pasa de tener un valor del 15 % a las 5 h a alcanzar un valor próximo al 60 % a las 23 h.

A velocidades de agitación elevadas, como ya se ha dicho, se observa una importante disminución de los tres parámetros, siendo esta disminución mayor cuanto más elevada es la agitación. En cuanto a la influencia de la edad celular en este caso, los valores más altos en los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} se observan con las células obtenidas a las 15 h del crecimiento para 500 rpm y con las células obtenidas a las 10 h para 800 rpm.

Tabla 5.3 - Valores de los parámetros X_{DBT} y X_{HBP} calculados a partir de los ensayos de BDS para cada velocidad de agitación y para cada edad de crecimiento, 5, 10, 15 y 23 h.

N (rpm)	Células de 5 horas		Células de 10 horas		Células de 15 horas		Células de 23 horas	
	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)	X_{HBP} (%)
100	51,00	15,93			91,90	41,80	100,00	57,43
200	56,71	13,17			96,50	44,03	100,00	61,41
300	50,04	10,64			98,20	37,00	100,00	57,72
500	24,10	0,00			80,37	20,93	49,37	5,94
800	12,36	0,00	28,72	1,96	10,20	0,00		

Al igual que se hizo en el estudio con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, se ha llevado a cabo la comparación de los **parámetros relacionados con el crecimiento** q_{O_2} , μ y C_X^{max} con los **parámetros de la biodesulfuración** (X_{DBT} y X_{HBP}).

Del mismo modo, se ha tratado de realizar una comparación similar buscando células que estuvieran en “estado metabólico” equivalente. En este caso, también se ha elegido el inicio de la **fase estacionaria de crecimiento** como criterio para comparar las edades celulares elegidas en la experimentación. Así, en la Figura 5.20, se puede observar que, para los ensayos llevados a cabo con células obtenidas a velocidades de agitación bajas -100, 200 y 300 rpm-, el inicio de la fase estacionaria coincide, aproximadamente, con la hora 23 del proceso y a las velocidades de agitación elevadas -500 y 800 rpm-, se ha tomado la hora 15 del proceso de crecimiento.

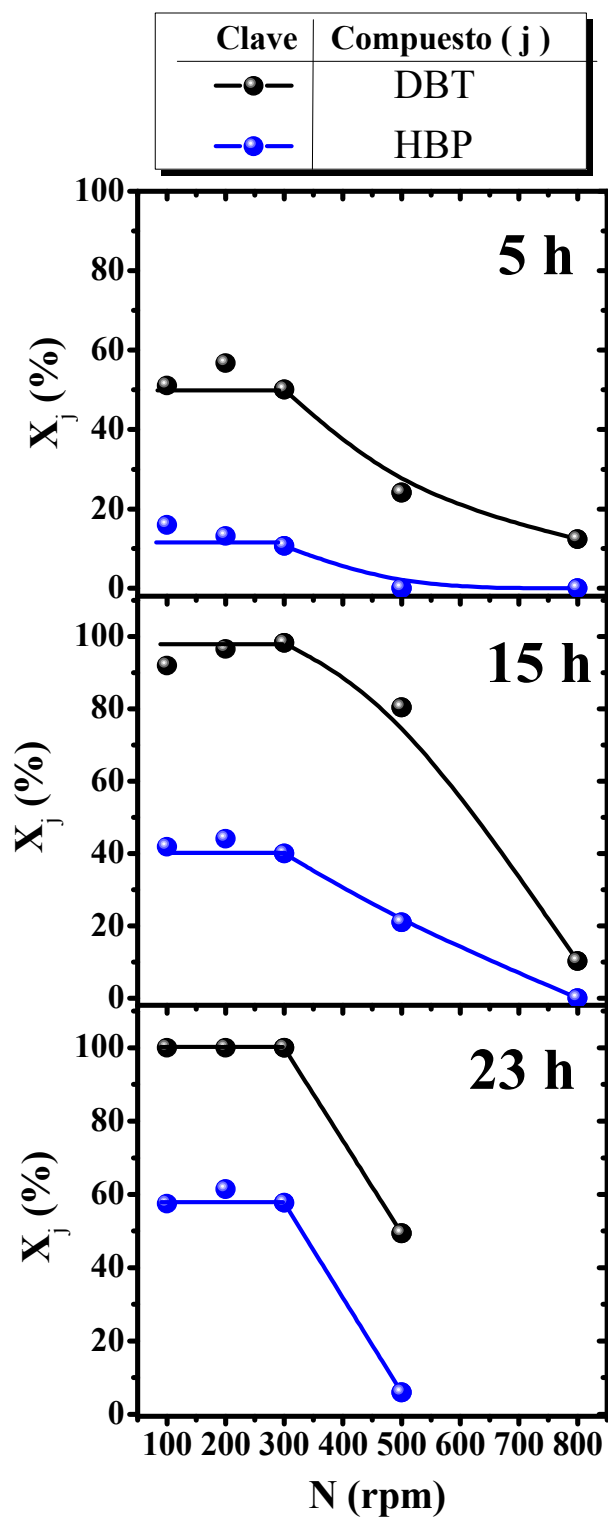


Figura 5.19 - Evolución de los Parámetros X_{DBT} y X_{HBP} en función de las condiciones hidrodinámicas estudiadas. (Los valores de los parámetros de 800 rpm a las 10 h - $X_{DBT} = 28,72\%$, $X_{HBP} = 1,96\%$ -, no se muestran en la figura).

Capacidad desulfurante y condiciones fluidodinámicas

En la Tabla 5.4 se muestran los valores de los parámetros de crecimiento y de biodesulfuración mencionados para cada velocidad de agitación. A su vez, en la Figura 5.20 se han representado los valores de dichos parámetros en función de las velocidades de agitación. Como puede observarse, las condiciones hidrodinámicas influyen de manera distinta sobre el crecimiento y sobre la capacidad desulfurante. En las condiciones donde la velocidad de agitación son bajas (de 100 a 300 rpm), es decir, donde hay una baja concentración de oxígeno disuelto disponible para el microorganismo (microaerobiosis), los valores de q_{O_2} , μ y C_X^{max} son los más bajos, aunque, en este intervalo de agitaciones, los parámetros relacionados con la biodesulfuración (X_{DBT} y X_{HBP}) no presentan diferencias significativas. Por el contrario, a velocidades de agitación elevadas (500 y 800 rpm), los parámetros de crecimiento aumentan de forma importante, mientras que los relacionados con la BDS sufren una disminución drástica. Es decir, que al mejorar las condiciones de transferencia de oxígeno al medio de cultivo, el crecimiento de *P. putida* KTH2 se ve favorecido pero la capacidad de biodesulfuración disminuye de forma drástica.

Para tratar de dar una explicación a estos resultados, se ha planteado un estudio experimental para analizar la actividad de las enzimas DszC, DszA y DszB, encargadas de catalizar las respectivas etapas de la ruta 4S de biodesulfuración, determinando cuál de ellas puede ser la más sensible, que pueda ser influenciada por los cambios metabólicos que sufre *P. putida* KTH2 cuando son modificadas las condiciones hidrodinámicas para su crecimiento, al pasar de un ambiente de microaerobiosis a un ambiente en el que se le suministra el suficiente oxígeno para su crecimiento.

Tabla 5.4 - Valores de los parámetros de crecimiento (q_{O_2} , μ y C_X^{max}) y de los parámetros de biodesulfuración X_{DBT} y X_{HBP} correspondientes a las 24 horas de crecimiento para cada velocidad de agitación.

N (rpm)	$q_{O_2} \cdot 10^6$ (mol/g · s)	μ (h ⁻¹)	C_X^{max} (g/L)	X_{HBP} (%)	X_{DBT} (%)
100	0,37	0,09	1,33	57,43	100,00
200	1,77	0,12	1,76	61,41	100,00
300	3,56	0,19	2,55	57,72	100,00
500	6,60	0,36	3,65	20,93	80,37
800	8,62	0,44	5,07	0,00	10,20

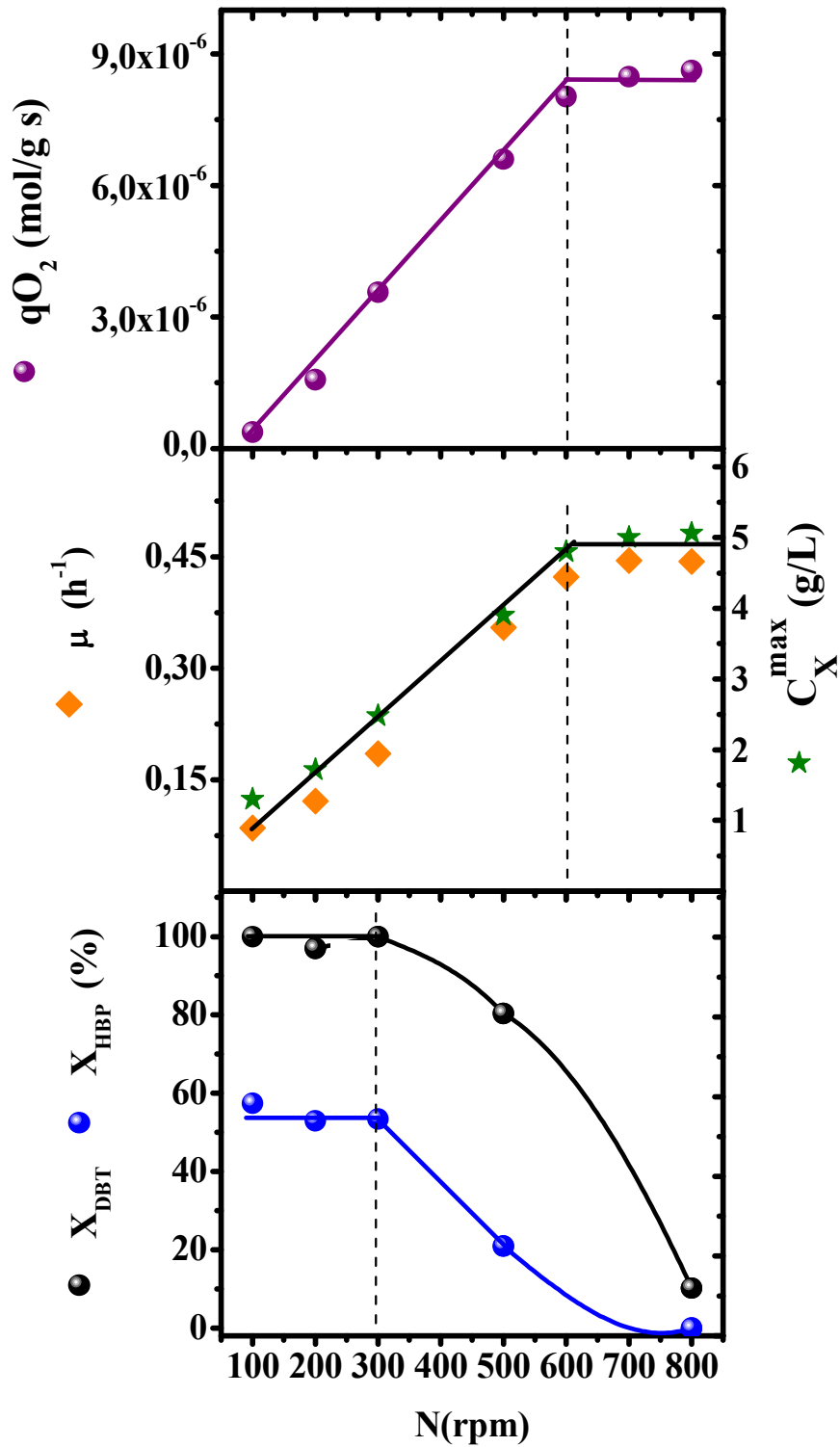


Figura 5.20 - Evolución de los parámetros de crecimiento (q_{O_2} , μ y C_X^{max}) y de los parámetros de biodesulfuración X_{DBT} y X_{HBP} obtenidos para 100, 200, 300, 500 y 800 rpm.

5.3. ESTUDIO de las ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS en *P. putida* KTH2

Los primeros estudios del crecimiento de *P. putida* en biorreactor establecieron que las condiciones de operación óptimas para la producción del biocatalizador son 200 rpm y 1 L/L/min (Martin y col., 2004; Martin y col., 2005). En trabajos posteriores (Martin, 2005, Calzada y col., 2009, Calzada, 2010) se realizó un estudio de las actividades de las enzimas de la ruta 4S, observándose que las enzimas monooxigenasas DszC y DszA, que catalizan las primeras etapas de la ruta 4S, aumentaban su actividad durante el tiempo de crecimiento; por el contrario, la enzima desulfinaasa DszB presentaba un valor máximo de actividad a edades celulares tempranas, disminuyendo la actividad enzimática conforme avanza el tiempo de crecimiento. Además, Calzada y col. (2009) comprobaron que había un incremento de la concentración y la actividad de las enzimas DszC y DszA con la edad celular. Por el contrario, la enzima DszB, a pesar de aumentar también su concentración con la edad celular, su actividad disminuye con el tiempo. Este hecho podría deberse a algún tipo de inactivación, muy probablemente debida a la oxidación de la enzima desulfinaasa (DszB) durante el tiempo de crecimiento.

Considerando los mencionados trabajos, se ha llevado a cabo el estudio de las **actividades enzimáticas** de las enzimas de la ruta 4S en *P. putida* KTH2 con células obtenidas durante los experimentos de crecimiento realizados a las velocidades de agitación estudiados en el Capítulo 4; esto es a 100, 200, 300, 500 y 800 rpm. En la Figura 5.21 se muestra un esquema simplificado del procedimiento que se ha seguido. Como puede observarse, durante el crecimiento, a cada una de las velocidades de agitación, se han tomado muestras representativas de diferentes edades celulares -5, 10, 15 y 23 horas- para todos los experimentos, a excepción del realizado a 800 rpm, donde no era posible tomar la muestra de 23 horas.

5.3.1. Resultados experimentales

Para la determinación de la actividad enzimática, se han realizado ensayos de *resting cells* empleando como sustratos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS según la enzima objeto de estudio. Así, para la determinación de la actividad DszC, que cataliza las dos primeras etapas de la ruta 4S, se ha empleado DBT como sustrato para la determinación

de la actividad de esta enzima en la primer reacción de la ruta, y DBTO para la determinación de la actividad en la segunda etapa; para analizar la actividad de la DszA, se ha empleado DBTO₂ como sustrato; y para la enzima DszB, se ha utilizado HBPS como sustrato en el experimento de *resting cell*. En todos los experimentos se han medido las concentraciones de los compuestos de la ruta 4S siguiendo el método de análisis detallado en el Apartado 2.3.2.3. A continuación, al igual que en los trabajos antes citados, se ha determinado la actividad enzimática como la actividad a tiempo cero, es decir, la extrapolación a tiempo cero de la variación con el tiempo de la concentración del sustrato correspondiente, según la expresión [2.1], definida en el Apartado 2.3.1.5.

En las Tablas 5.5 a 5.9 se muestra la evolución de la concentración de cada uno de los compuestos empleados como sustrato en los ensayos de *resting cell* realizados con células obtenidas empleando en el crecimiento agitaciones de 100, 200, 300, 500 y 800 rpm, respectivamente.

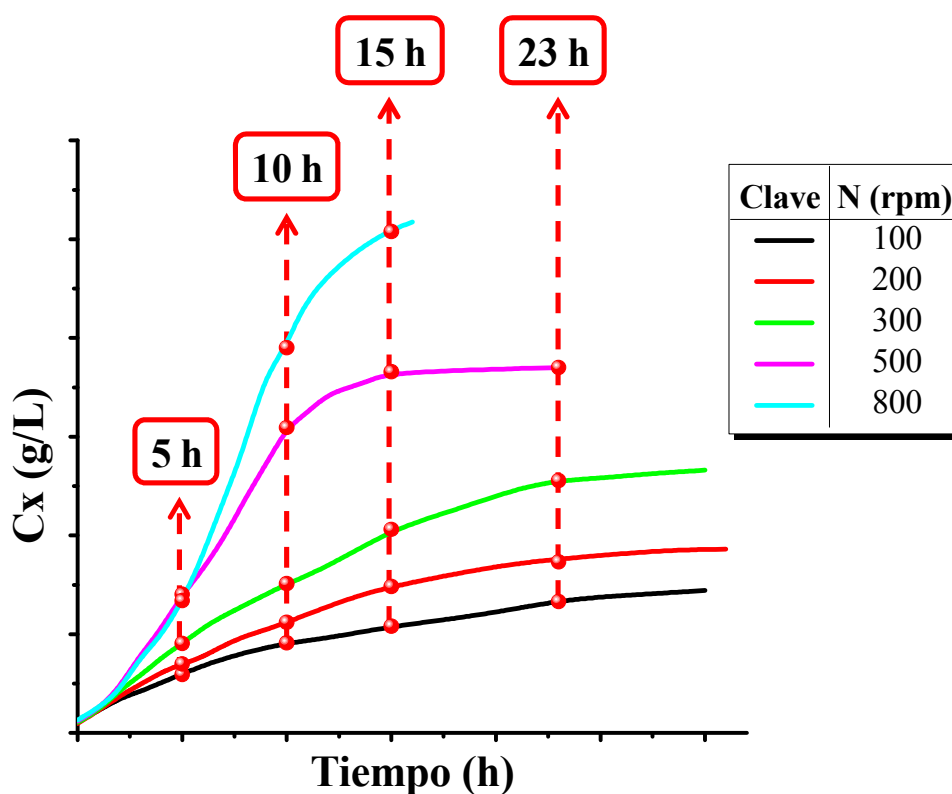


Figura 5.21 - Representación esquemática del procedimiento de toma de muestras para el estudio de las actividades enzimáticas de la ruta 4S en *P. putida* KTH2.

Tabla 5.5 - Resultados obtenidos empleando células de 5, 10, 15 y 23 h para la desulfuración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS. 100 rpm.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)				C_{DBTO} (μM)				C_{DBTO₂} (μM)				C_{HBPS}(μM)			
	Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)			
	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23
0	10,00	10,23	10,10	10,00	9,90	10,21	10,10	10,10	10,10	10,26	10,10	10,00	10,00	10,21	10,00	10,10
15	8,10	7,23	6,10	3,20	7,40	6,43	5,20	3,60	7,70	6,30	4,70	3,20	7,00	7,50	7,70	8,20
30	6,90	5,34	3,60	1,40	6,60	4,80	2,80	1,20	6,80	4,67	2,40	1,10	4,70	5,66	6,40	7,10
45	6,30	4,38	2,30	0,60	6,10	3,98	1,70	0,50	6,20	3,86	1,40	0,40	3,20	4,44	5,50	6,10
60	5,90	3,77	1,50	0,40	5,90	3,47	0,90	0,10	5,90	3,45	0,90	0,00	2,30	3,73	5,00	5,60
90	5,10	3,16	1,10	0,20	5,30	2,71	0,00	0,00	5,10	2,79	0,40	0,00	1,30	2,81	4,20	5,10
120	4,90	2,90	0,80	0,00	5,00	2,55	0,00	0,00	4,50	2,39	0,20	0,00	0,80	2,30	3,70	4,80

Tabla 5.6 - Resultados obtenidos empleando células de 5, 10, 15 y 23 h para la desulfuración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS. 200 rpm.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)				C_{DBTO} (μM)				C_{DBTO₂} (μM)				C_{HBPS}(μM)			
	Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)			
	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23
0	10,00	10,18	10,00	10,00	10,10	10,28	10,10	10,10	10,00	10,18	10,00	10,10	10,10	10,23	10,00	10,00
15	8,00	7,58	6,90	2,50	7,20	6,77	6,10	2,50	7,00	6,36	5,50	3,60	8,00	7,84	7,40	8,20
30	6,80	5,55	4,10	0,70	6,30	4,94	3,40	0,70	6,20	4,68	3,00	1,20	5,80	6,01	6,00	7,10
45	5,90	4,33	2,60	0,30	5,80	4,07	2,20	0,30	5,90	3,92	1,80	0,50	4,40	4,63	4,70	6,10
60	5,30	3,61	1,80	0,00	5,60	3,51	1,30	0,00	5,60	3,41	1,10	0,10	3,50	3,82	4,00	5,60
90	4,70	2,80	0,80	0,00	5,10	2,80	0,40	0,00	4,90	2,70	0,40	0,00	2,60	2,95	3,20	5,10
120	4,30	2,39	0,40	0,00	4,80	2,55	0,20	0,00	4,20	2,24	0,20	0,00	2,00	2,39	2,70	4,80

Tabla 5.7 - Resultados obtenidos empleando células de 5, 10, 15 y 23 h para la desulfuración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS. 300 rpm.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)				C_{DBTO} (μM)				C_{DBTO₂} (μM)				C_{HBPS}(μM)			
	Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)			
	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23
0	10,00	10,18	10,00	10,00	10,00	10,23	10,10	10,00	10,00	10,23	10,10	10,10	10,10	10,23	10,00	10,00
15	8,00	7,89	7,50	4,00	7,70	7,33	6,70	4,20	8,10	7,99	7,60	3,90	7,70	8,09	8,20	8,70
30	6,50	5,85	5,00	1,80	6,90	5,60	4,10	2,10	7,30	6,01	4,50	1,50	5,60	6,46	7,10	7,70
45	5,80	4,53	3,10	0,80	6,40	4,58	2,60	1,10	6,60	4,78	2,80	0,70	4,30	5,29	6,10	6,80
60	5,30	3,66	1,90	0,50	6,10	4,02	1,80	0,50	5,90	4,02	2,00	0,30	3,40	4,58	5,60	6,30
90	5,10	2,95	0,70	0,20	5,20	3,05	0,80	0,10	4,70	2,85	0,90	0,20	2,50	3,87	5,10	5,70
120	5,00	2,65	0,20	0,00	4,60	2,55	0,40	0,00	3,90	2,19	0,40	0,00	1,90	3,41	4,80	5,40

Tabla 5.8 - Resultados obtenidos empleando células de 5, 10, 15 y 23 h para la desulfuración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS. 500 rpm.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)				C_{DBTO} (μM)				C_{DBTO₂} (μM)				C_{HBPS}(μM)			
	Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)				Edad celular (h)			
	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23	5	10	15	23
0	10,10	10,28	10,10	10,10	10,10	10,23	10,00	10,10	10,10	10,28	10,10	10,10	10,00	10,23	10,10	10,10
15	8,20	8,30	8,10	8,60	8,00	7,69	7,10	7,60	8,00	7,58	6,90	7,17	8,20	8,86	9,20	9,30
30	8,10	7,18	6,00	7,50	7,50	6,26	4,80	5,70	7,40	5,85	4,10	4,26	7,00	7,89	8,50	8,60
45	8,00	6,31	4,40	6,40	7,20	5,40	3,40	4,20	7,10	4,94	2,60	2,70	6,40	7,23	7,80	7,80
60	7,90	5,80	3,50	5,90	6,90	4,78	2,50	3,30	6,80	4,38	1,80	1,87	5,90	6,62	7,10	7,10
90	7,70	5,24	2,60	5,40	6,40	4,07	1,60	2,50	6,30	3,61	0,80	0,83	5,40	6,01	6,40	6,40
120	7,60	4,89	2,00	5,10	6,00	3,61	1,10	1,90	5,90	3,21	0,40	0,42	5,10	5,70	6,10	6,10

Capacidad desulfurante y condiciones fluidodinámicas

Tabla 5.9 - Resultados obtenidos empleando células de 5, 10 y 15 h para la desulfuración de los compuestos DBT, DBTO, DBTO₂ y HBPS. 800 rpm.

t_{BDS} (min)	C_{DBT} (μM)			C_{DBTO} (μM)			C_{DBTO₂} (μM)			C_{HBPS}(μM)		
	Edad celular (h)			Edad celular (h)			Edad celular (h)			Edad celular (h)		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
0	10,0	10,0	10,0	10,1	10,1	10,1	10,0	10,0	10,1	10,1	10,0	10,0
15	8,0	6,9	2,5	7,2	6,1	2,5	7,0	5,5	3,6	8,0	7,4	8,2
30	6,8	4,1	0,7	6,3	3,4	0,7	6,2	3,0	1,2	5,8	6,0	7,1
45	5,9	2,6	0,3	5,8	2,2	0,3	5,9	1,8	0,5	4,4	4,7	6,1
60	5,3	1,8	0,0	5,6	1,3	0,0	5,6	1,1	0,1	3,5	4,0	5,6
90	4,7	0,8	0,0	5,1	0,4	0,0	4,9	0,4	0,0	2,6	3,2	5,1
120	4,3	0,4	0,0	4,8	0,2	0,0	4,2	0,2	0,0	2,0	2,7	4,8

5.3.2. Discusión de los resultados

La aplicación del método para la determinación de la actividad a tiempo cero proporciona los resultados que se muestran en las Figuras 5.22 a 5.26. En estas figuras se han representado los valores de las actividades de las enzimas DszC (empleando como sustratos DBT y DBTO), DszA (sustrato DBTO₂) y DszB (sustrato HBPS) para cada velocidad de agitación estudiada. Para una mejor visualización de la influencia de la edad celular en la evolución de las actividades enzimáticas, se ha representado también la correspondiente curva de crecimiento.

El análisis de cada figura pone de manifiesto que, con independencia de la velocidad de agitación con la que se haya llevado a cabo el crecimiento de *P. putida* KTH2, hay una clara influencia de la edad celular en las actividades de las enzimas de la ruta de biodesulfuración. Así, la evolución de las enzimas DszC (tanto si se emplea DBT como DBTO) y de la enzima DszA obtenida en los experimentos correspondientes a 100 rpm (Figura 5.22), 200 rpm (Figura 5.23) y 300 rpm (Figura 5.24), es muy similar. Ambas enzimas muestran un aumento de su actividad a lo largo del tiempo del crecimiento. La enzima DszB presenta una evolución muy diferente ya que se tiene un valor máximo a edades celulares tempranas (5 horas), y luego disminuye con el tiempo de crecimiento, manteniéndose en valores muy bajos. En cuanto a los resultados obtenidos a 500 rpm (Figura 5.25) y 800 rpm (Figura 5.26), las actividades de las enzimas DszC y DszA observadas para el experimento de 500 rpm aumentan con la edad celular, alcanzando su valor máximo al comienzo de la fase estacionaria de

crecimiento y disminuyendo ligeramente a las 23 horas. Para 800 rpm, los valores de estas actividades enzimáticas también aumentan con el tiempo de crecimiento, pero en este caso alcanzan su valor máximo en la hora 10, tiempo a partir del cual disminuye su valor. Respecto a la enzima DszB, tanto para 500 rpm como para 800 rpm, la actividad máxima se alcanza a edades muy tempranas del crecimiento (5 horas), disminuyendo posteriormente su valor.

Para realizar una comparación cuantitativa del estudio de las actividades enzimáticas, en la Figura 5.27 se muestran los valores de las actividades de las enzimas DszC, DszA y DszB con respecto al tiempo para todas las condiciones hidrodinámicas estudiadas. De la citada figura se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Las enzimas **monoxigenasas DszC y DszA** muestran los valores de actividad máximos a edades celulares más tardías del crecimiento. En cuanto a la influencia de las condiciones hidrodinámicas, los valores de actividad de estas enzimas son muy similares a velocidades de agitación bajas (100, 200 y 300 rpm) que se encuentran en torno a $0,7 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$; por el contrario, a velocidades de agitación más altas (500 y 800 rpm), estas enzimas presentan valores significativamente bajos, en torno a $0,15\text{-}0,2 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$.
- La enzima **DszB o desulfinasas**, muestra los valores de actividad máximos a edades celulares tempranas del crecimiento, esto es, a las 5 horas. La influencia de las condiciones hidrodinámicas es muy significativa, ya que el valor más alto de actividad DszB es el obtenido con las células crecidas a 100 rpm ($0,321 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$). Este valor de actividad se ve reducido de forma gradual con el aumento de la velocidad de agitación; así, para la misma edad celular, a 200 rpm, es $0,223 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$; a 300 rpm, es $0,212 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$; a 500 rpm, es $0,096 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$; y, por último, a 800 rpm es $0,043 \mu\text{M/g}\cdot\text{min}$.

De esta manera, se puede afirmar que, aunque la velocidad de agitación influye en las actividades de todas las enzimas de la ruta 4S, las monoxigenasas DszC y DszA se ven afectadas solo a partir de velocidades de agitación elevadas; sin embargo, la actividad de la enzima DszB se afecta de manera importante en cuanto las condiciones hidrodinámicas cambian, ya que hay una disminución de su actividad enzimática incluso en el intervalo de bajas agitaciones. Por tanto, todo lo observado en el estudio de actividades enzimáticas parece corroborar la posible inactivación por oxidación de la

desulfinasa DszB. Se ha observado que esta enzima se afecta de forma negativa a dos niveles: por el tiempo de crecimiento y con el incremento en la velocidad de agitación.

Finalmente, para realizar un análisis de los resultados anteriormente descritos, de igual forma que se hizo con los resultados mostrados en la Figura 5.20, se ha llevado a cabo la comparación de los parámetros relacionados con el crecimiento y la biodesulfuración con las actividades enzimáticas DszC, DszA y DszB, obtenidos para 100, 200, 300, 500 y 800 rpm, para un estado metabólico semejante (Figura 5.28). Así pues, esta influencia diferente que tienen las condiciones hidrodinámicas sobre el crecimiento y sobre la capacidad desulfurante, que se observa en la Figura 5.20, se aprecia también en la Figura 5.28. En este último caso (Figura 5.28), la distinta influencia se debe claramente a que todas las enzimas, especialmente la DszB, encargadas de catalizar las respectivas reacciones de la ruta 4S de biodesulfuración, se ven afectadas para velocidades de agitación superiores a 500 rpm.

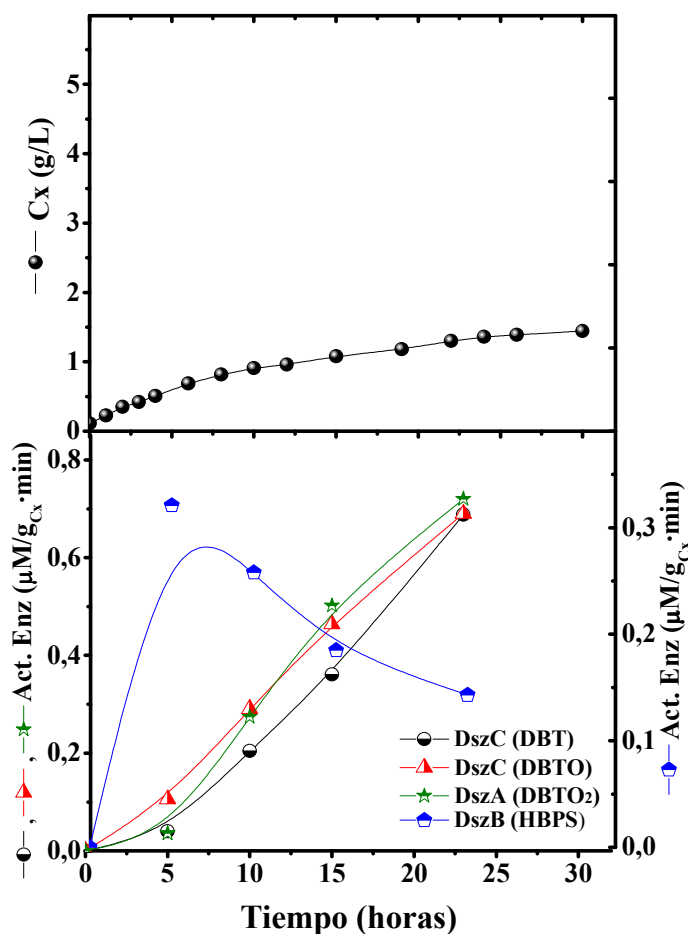


Figura 5.22 - Evolución de las actividades de las enzimas DszC (para DBT y DBTO), DszA y DszB a lo largo del crecimiento llevado a cabo a una velocidad de agitación de 100 rpm.

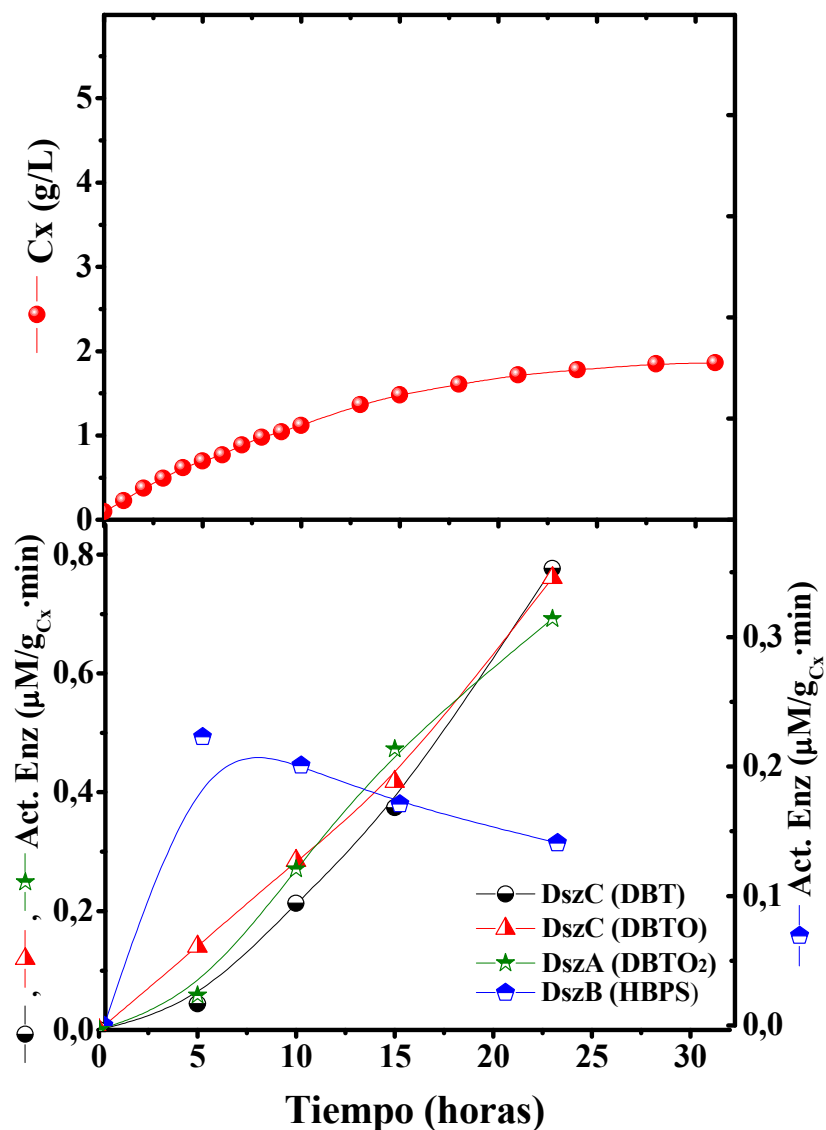


Figura 5.23 - Evolución de las actividades de las enzimas DszC (para DBT y DBTO), DszA y DszB a lo largo del crecimiento llevado a cabo a una velocidad de agitación de 200 rpm.

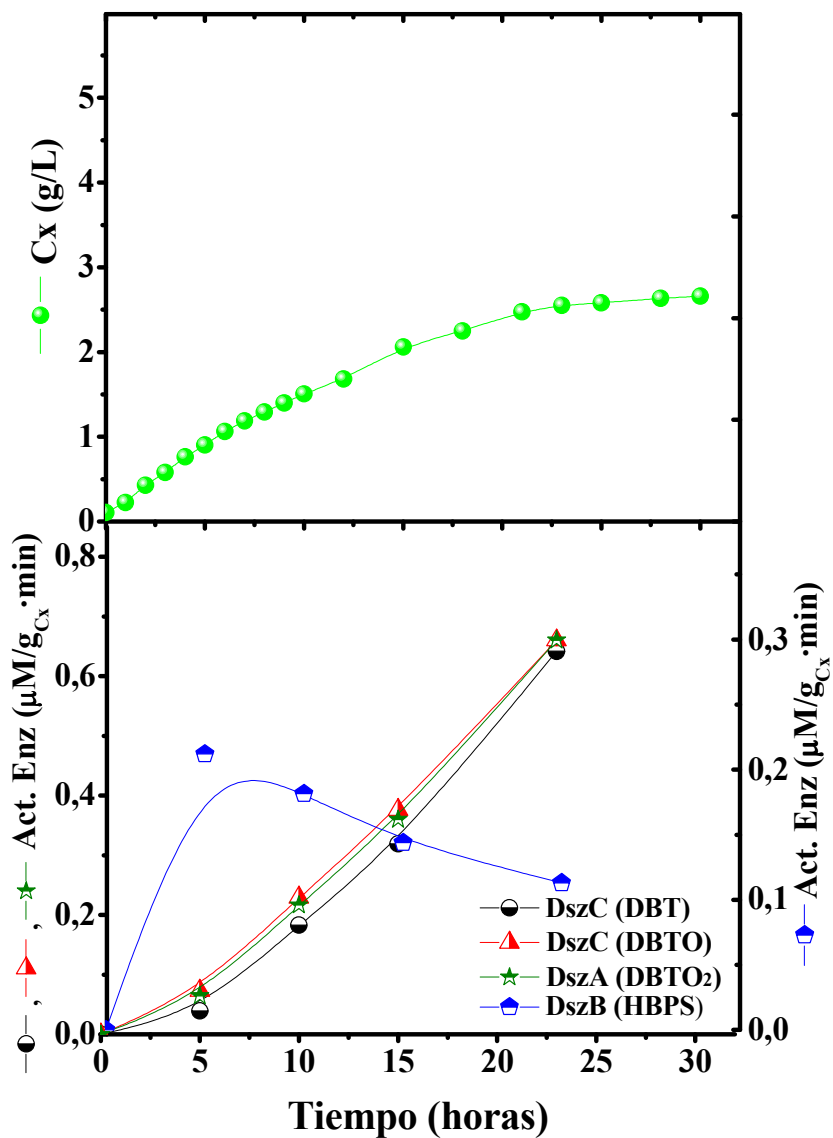


Figura 5.24 - Evolución de las actividades de las enzimas *DszC* (para DBT y DBTO), *Dsz A* y *DszB* a lo largo del crecimiento llevado a cabo a una velocidad de agitación de 300 rpm.

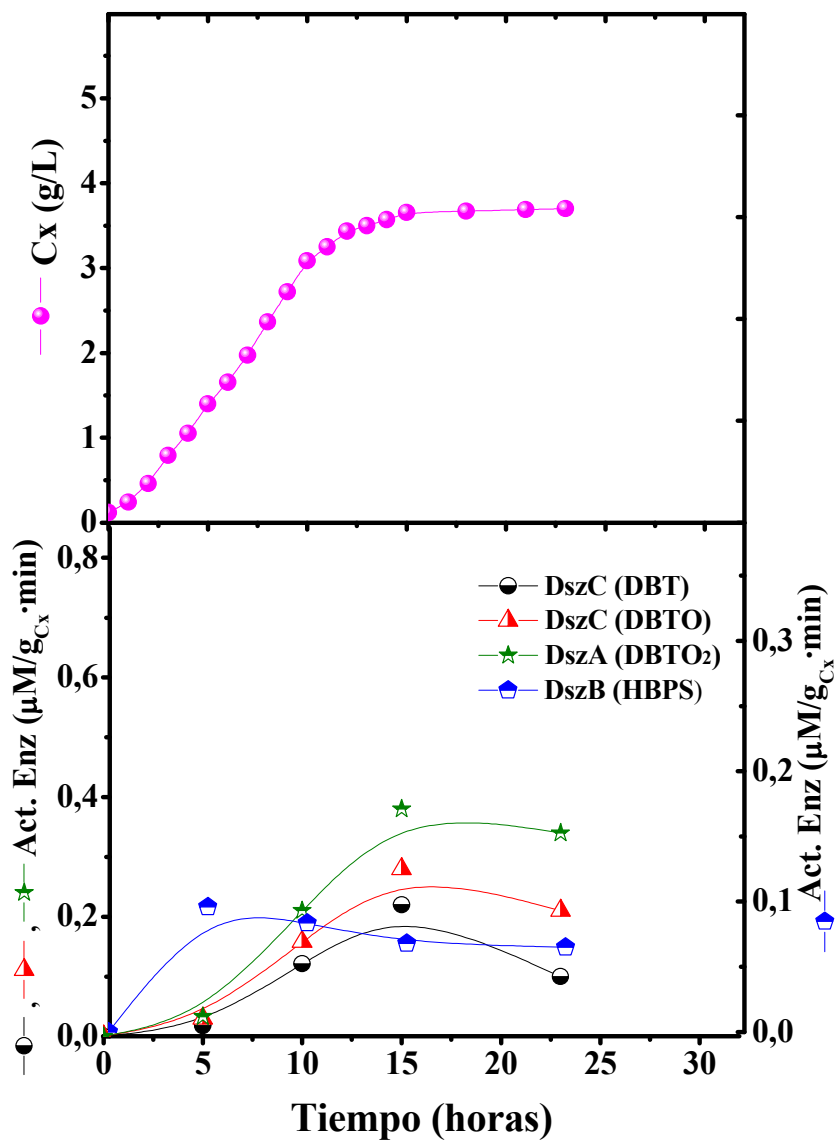


Figura 5.25 - Evolución de las actividades de las enzimas DszC (para DBT y DBTO), Dsz A y DszB a lo largo del crecimiento llevado a cabo a una velocidad de agitación de 500 rpm.

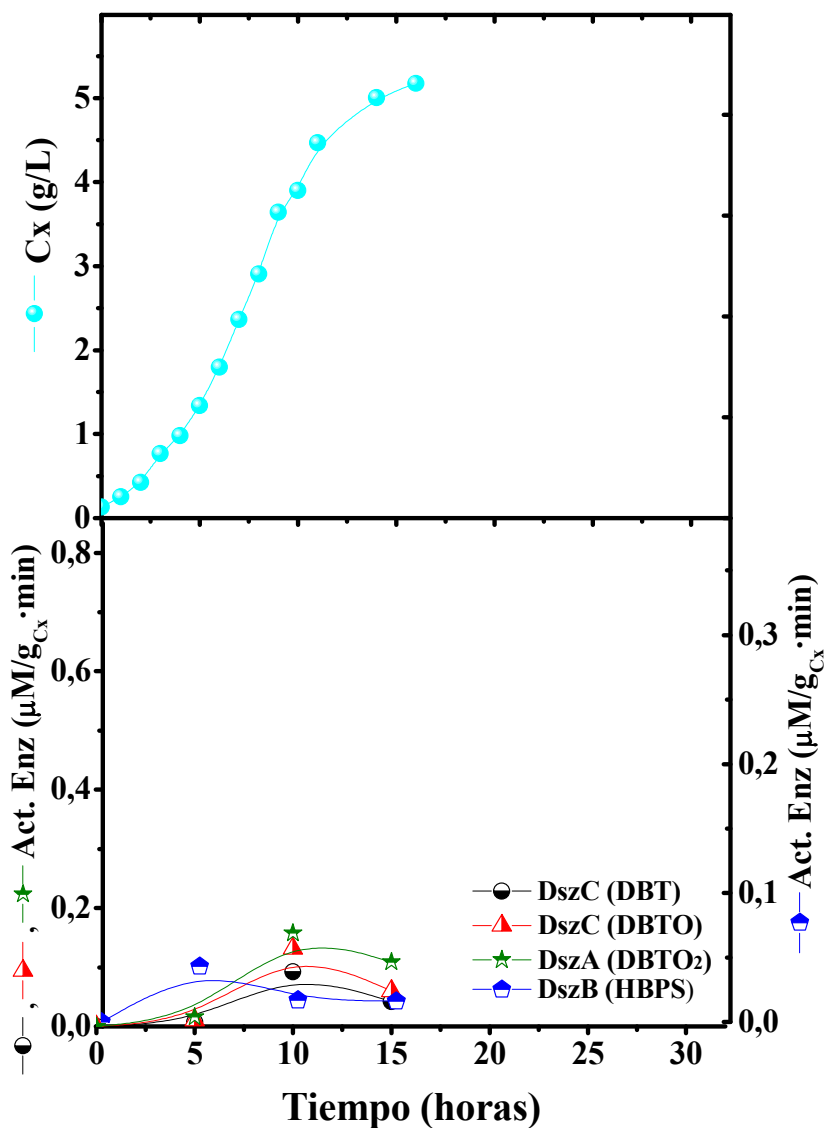


Figura 5.26 - Evolución de las actividades de las enzimas *DszC* (para DBT y DBTO), *Dsz A* y *DszB* a lo largo del crecimiento llevado a cabo a una velocidad de agitación de 800 rpm.

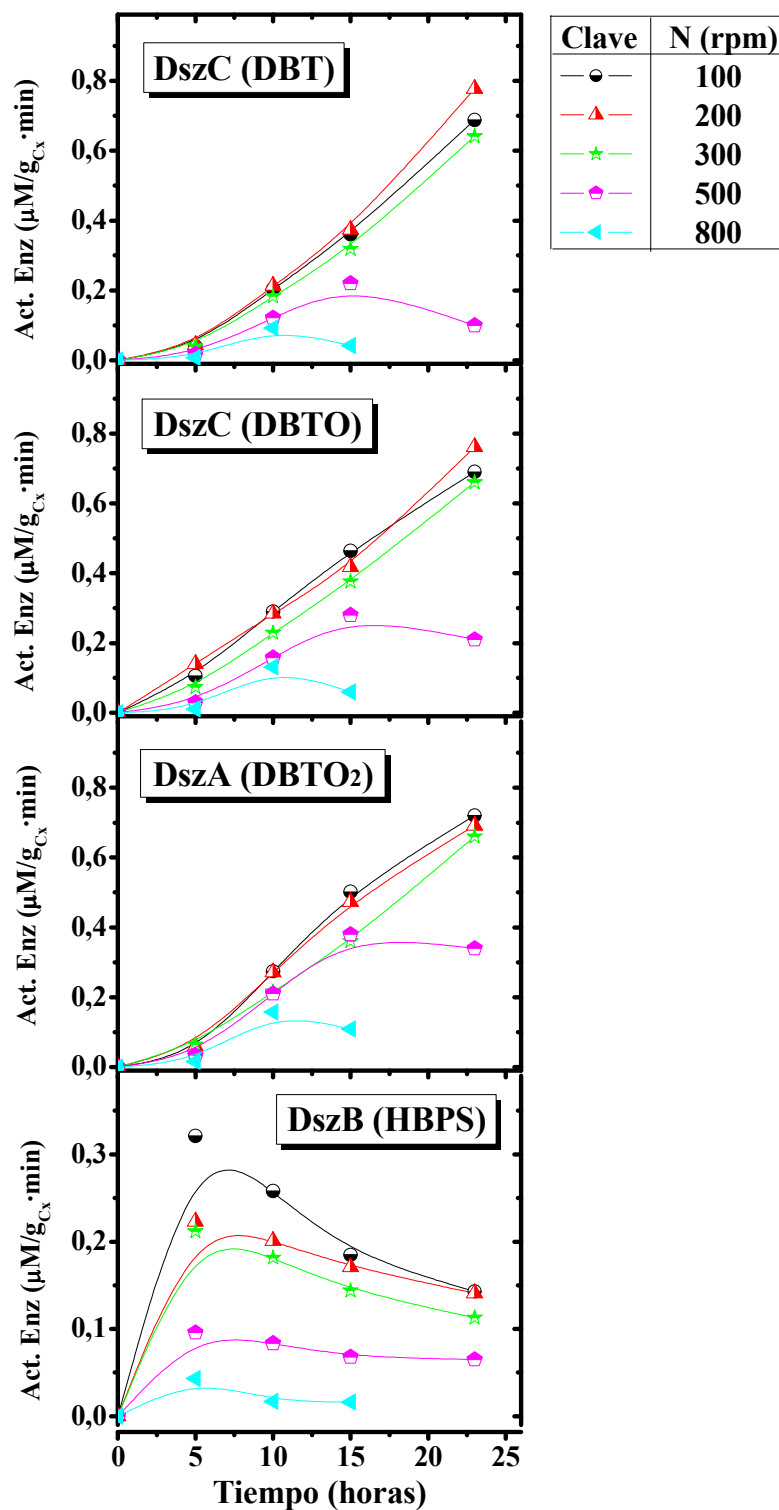


Figura 5.27 - Evolución de los valores de las actividades de las enzimas *DszC*, *DszA* y *DszB* alcanzados con células obtenidas bajo condiciones hidrodinámicas diferentes (100, 200, 300, 500 y 800 rpm).

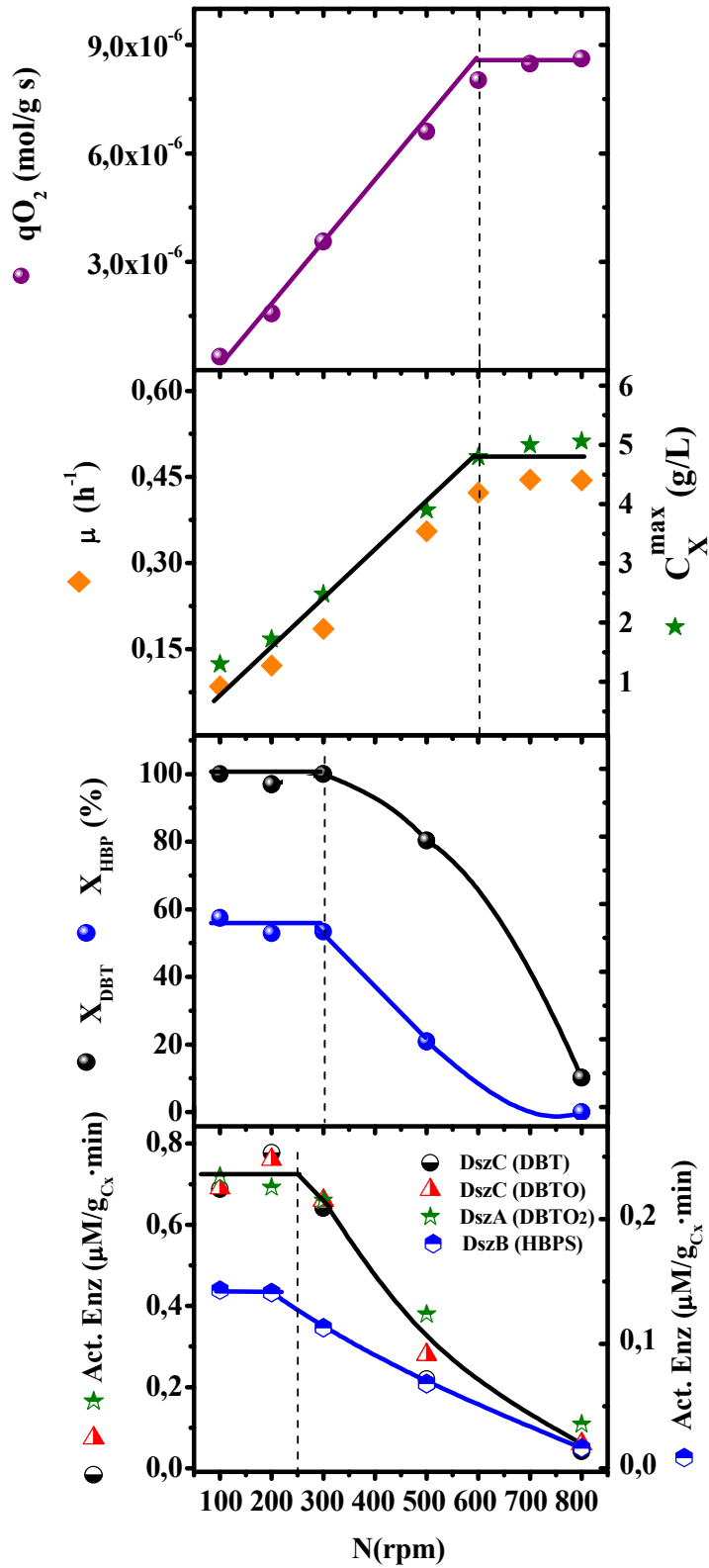


Figura 5.28 - Evolución de los parámetros de crecimiento, de los parámetros de biodesulfuración X_{DBT} y X_{HBP} y de las actividades enzimáticas $DszC$, $DszA$ y $DszB$ obtenidos para 100, 200, 300, 500 y 800 rpm.

5.4. BIBLIOGRAFIA

Calzada, J.; Zamarro, M. T.; Alcon, A.; Santos, V. E.; Diaz E.; Garcia J. y Garcia-Ochoa F., **2009**. Analysis of Dibenzothiophene Desulfurization in a Recombinant *Pseudomonas putida* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 875-877.

Calzada, J., **2010**. Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT5279: formas de operación. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Gomez, E.; Santos V.E.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., **2006a**. Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy fuels.* **20**, 1565-1571.

Gomez, E.; Santos V.E.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., **2006b**. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.

Iglesias, E., **2005**. Estudio de la ruta 4S de *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. Modelo cinético. Proyecto de investigación del título de Ingeniero Químico. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Martin, A. B. **2005**. Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT5279. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. E. y Garcia-Ochoa F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy Fuels.* **18**, 851-857.

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. y Garcia-Ochoa F., **2005**. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* **19**, 775-782.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005a**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005b**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **22**, 229-237.

Santos, V. E.; Alcon, A.; Galdeano, C.; Gomez, E. y Garcia-Ochoa, F., **2006**. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochem. Eng. J.* **32**, 198-204.

CAPÍTULO 6.
RESUMEN Y CONCLUSIONES

CAPÍTULO 6

RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.1. RESUMEN

Los bioprocesos forman parte esencial de muchos sectores de la industria química, como el farmacéutico y el alimentario, en los que se hace uso de microorganismos, células de animales o plantas y componentes celulares, tales como enzimas, para la elaboración de nuevos productos o la obtención de un servicio (como en el tratamiento de aguas residuales o la biorregeneración).

La mayoría de los microorganismos empleados en bioprocesos son de naturaleza aerobia, de manera que, entre los diversos factores nutricionales que influyen en ellos, el oxígeno es un sustrato clave utilizado por las células para generar la energía necesaria útil para llevar a cabo las reacciones de síntesis con las que el organismo se "fabricará" a sí mismo, así como la energía requerida para el mantenimiento celular y, en muchas ocasiones, para la síntesis de metabolitos, sean productos finales o intermedios de los ciclos metabólicos, enzimas u otras proteínas, etc, que son en sí los productos o servicios buscados en el bioproceso o intermedios fundamentales.

Los bioprocesos aerobios son sistemas heterogéneos gas-líquido-sólido que envuelven el transporte de materia y reacciones bioquímicas, normalmente de más de una especie o compuesto químico, simultáneamente. Por tanto, para que la transformación bioquímica tenga lugar de forma adecuada, se requiere que exista un buen contacto entre las tres fases presentes en el sistema, gas (aire) - líquido (medio) -

sólido (células), siendo la etapa controlante, en la mayoría de los casos, el transporte desde la fase gas a la fase líquida.

Como consecuencia de la baja solubilidad que presenta el oxígeno en el medio de cultivo, debe ser continuamente suministrado por una fase gas (generalmente aire) al medio líquido, con el fin de proporcionar a las células la cantidad de oxígeno disuelto que requieren. En estas condiciones, tanto la velocidad a la que éste se transporta (OTR) como la velocidad a la que es consumido por el microorganismo (OUR), son parámetros claves que están implicados en el diseño, operación y cambio de escala de los biorreactores. En estas condiciones, la aireación y la agitación de los biorreactores son aspectos importantes a fin de producir una velocidad de transporte de oxígeno eficaz en el medio de cultivo. Sin embargo, aunque en principio una mayor velocidad de agitación favorece el transporte de oxígeno en el sistema, también supone un cambio en el comportamiento fluidodinámico del mismo, ya que implica una mayor turbulencia, por lo que las fuerzas de cizalla y las interacciones con los elementos mecánicos y de las células entre sí se ven aumentados. Dentro de estas condiciones, debe considerarse la gran relevancia de los fenómenos hidrodinámicos que puedan acontecer en el fluido, ya que pueden ocasionar un daño celular a las células o estrés hidrodinámico.

En este trabajo se ha estudiado la influencia de las condiciones fluidodinámicas en biorreactores tipo tanque agitado en cultivos bacterianos aerobios. Para ello, se han utilizado tres bacterias: *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, *Pseudomonas putida* KTH2 y *Pseudomonas putida* natural. Las dos primeras bacterias son capaces de desulfurar DBT, la primera de forma natural y la segunda después de ser modificada genéticamente.

Se ha estudiado la influencia de las dos variables más significativas en un tanque agitado, la velocidad de agitación y el caudal de aire burbujeado, tanto en la velocidad de crecimiento de las citadas bacterias como en la capacidad desulfurante que acumulan las dos primeras durante dicho crecimiento. Todos los experimentos se han realizado en las condiciones de operación óptimas determinadas en trabajos previos (Olmo y col., 2005a y 2005b; Martín y col., 2004 y 2005).

En el estudio del crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 se han cultivado las células en operación discontinua en incubadora orbital, empleando matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio líquido y a una velocidad de agitación de 210 rpm; y en

biorreactor tipo tanque agitado bajo diferentes condiciones hidrodinámicas, modificando la velocidad de agitación entre 100 y 700 rpm, y el caudal de aire desde 1 hasta 10 L/min. Las respuestas analizadas durante el cultivo de las células han sido la evolución de la concentración de biomasa y la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo.

En la descripción del crecimiento se ha empleado un modelo cinético simple, no estructurado, como es la ecuación logística, que describe bien los resultados experimentales (C_x vs t). A partir de los parámetros cinéticos representativos de dicho modelo, la velocidad específica de crecimiento, μ , y la concentración máxima de biomasa, C_x^{max} , se han podido establecer las condiciones óptimas de crecimiento y/o determinar condiciones hidrodinámicas en las que el crecimiento del microorganismo se ve negativamente afectado. Para analizar los efectos de la hidrodinámica sobre el crecimiento, se ha definido un “factor de efectividad” para el crecimiento, η , expresado por la relación entre la velocidad específica de crecimiento experimental y la velocidad específica de crecimiento sin limitación por nutrientes o daño celular. Los resultados experimentales y los parámetros del modelo cinético ponen de manifiesto que la velocidad de crecimiento (y los parámetros η y C_x^{max}) cambian con las condiciones fluidodinámicas (velocidad de agitación, N , y caudal de aire, Q), sobre todo con N , siendo el efecto del caudal de aire prácticamente despreciable.

Durante el crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 se ha medido, por el método dinámico, OUR y OTR, calculando q_{O_2} y k_{La} . La evolución de los valores de q_{O_2} ponen de manifiesto que las condiciones fluidodinámicas influyen en el crecimiento de una forma similar a lo observado con los datos del propio crecimiento (C_x vs t , o los parámetros μ y C_x^{max}). Para determinar si los cambios macroscópicos observados son debidos a fenómenos de mezcla o de transferencia de materia (principalmente de oxígeno), o a efectos hidrodinámicos como consecuencia de los fenómenos asociados a la fluidodinámica del biorreactor, se ha calculado el número de *Damköhler* (Da) (Çalik y col., 2004; Garcia-Ochoa y col., 2010; Garcia-Ochoa y col., 2013).

Como consecuencia de estas observaciones, se puede proponer un método sencillo y rápido para determinar las condiciones fluidodinámicas en el que el crecimiento es limitado por el transporte de oxígeno o, en el extremo opuesto, cuando

las células son sometidas a un estrés, oxidativo o hidrodinámico, que influye notablemente en su comportamiento.

El estudio de la capacidad desulfurante de células de *R. erythropolis* IGTS8 se realizó para distintos tiempos de crecimiento y para distintas condiciones fluidodinámicas utilizadas en dicho crecimiento. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la capacidad desulfurante acumulada por las células depende de ambas variables, siendo la más relevante que dicha capacidad desulfurante cae drásticamente cuando el crecimiento es realizado aproximadamente bajo las mismas condiciones que resultan en afectar el crecimiento; es decir, para $N > 450$ rpm.

El estudio del crecimiento de *P. putida* KTH2 se llevó a cabo de forma paralela a lo descrito para *R. erythropolis* IGTS8. Se realizaron experimentos en operación discontinua en incubadora orbital, empleando matraces *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio líquido y a una velocidad de agitación de 210 rpm; y en biorreactor tipo tanque agitado bajo diferentes condiciones hidrodinámicas, modificando la velocidad de agitación entre 100 y 2000 rpm. Se ha modificado únicamente la velocidad de agitación tomando como referencia los resultados obtenidos con la bacteria *R. erythropolis*. En este caso se han considerado más respuestas: la evolución de las concentraciones de biomasa, de oxígeno disuelto, el consumo de la fuente de carbono -glicerol y ácido glutámico- y la variación del pH.

Se detectó una conducta diferente según la velocidad de agitación empleada. Para agitaciones bajas (desde 100 hasta 500 rpm), el comportamiento se debe a una situación de baja velocidad de aporte o transporte de oxígeno; sin embargo, para altas velocidades de agitación (desde 600 hasta 2000 rpm), el transporte de oxígeno es más rápido que otros fenómenos y no controla la velocidad del proceso global. En este caso, no se detectó, incluso a 2000 rpm, ningún signo de estrés en el crecimiento de las células.

Se aplicó un modelo cinético para describir el crecimiento similar al empleado en el caso de *R. erythropolis* IGTS8, pero los resultados no fueron completamente satisfactorios. Así que se probaron distintos modelos cinéticos, incluyendo el efecto de la concentración de biomasa, C_x (autocatalítico), y el del oxígeno (como sustrato limitante), llegándose a un modelo cinético empírico capaz de describir los resultados en todo el intervalo de experimentos estudiado.

El distinto comportamiento en el crecimiento de *P. putida* KTH2 a bajas y altas agitaciones se puso de manifiesto en todas las respuestas seguidas (η , C_x^{\max} , consumo de la fuente de carbono, pH, etc.).

De igual forma, se llevó a cabo un estudio del consumo de oxígeno. Al ser la demanda de oxígeno de este microorganismo muy grande, no pudo aplicarse el método dinámico clásico para determinar OUR, como se hizo en el caso de *R. erythropolis* IGTS8. En el caso de *P. putida* KTH2 se estimó el valor de k_{La} de acuerdo a un método previamente establecido (Garcia-Ochoa y Gomez, 2005; Gomez y col., 2006a y 2006b; Garcia-Ochoa y Gomez, 2010), calculando OTR, y a partir de este valor y teniendo en cuenta la variación de oxígeno con el tiempo durante el crecimiento, se calcularon los valores de OUR y del consumo específico, q_{O_2} . Los resultados mostraron un comportamiento similar al detectado con otras respuestas, muy diferente a bajas agitaciones (≤ 500 rpm) si se compara con el observado a altas velocidades de agitación (≥ 600 rpm).

Para comprobar si, en principio, esta conducta observada se debía a que *P. putida* KTH2 es un microorganismo modificado genéticamente, se repitió el mismo estudio con la cepa salvaje, *Pseudomonas putida* natural. Las variables estudiadas, los métodos empleados y los resultados obtenidos con dicha cepa natural fueron muy similares a los que se habían obtenido anteriormente con la cepa KTH2. Aunque los valores de los parámetros son distintos (la cepa natural crece más y a mayor velocidad y consume más oxígeno que la cepa KTH2), a grandes rasgos los resultados son muy similares.

Finalmente, de forma paralela a lo que se hizo con *R. erythropolis* IGTS8, se ha medido la capacidad desulfurante de *P. putida* KTH2 variando las condiciones fluidodinámicas. Los resultados muestran un comportamiento muy similar al observado para *Rhodococcus*, de forma que la capacidad desulfurante depende del tiempo de crecimiento y de las condiciones fluidodinámicas durante dicho crecimiento en el biorreactor. Lo más relevante es que la capacidad desulfurante cae drásticamente cuando el crecimiento es realizado a velocidades de agitación mayores o iguales a 500 rpm.

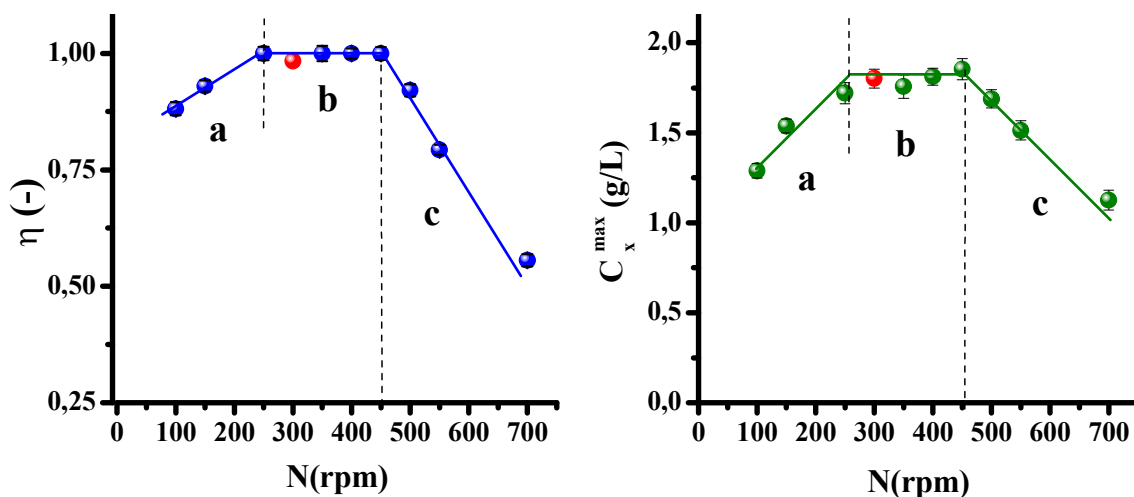
En el caso de *P. putida* KTH2, como se demostró en casos anteriores (Alcon y col., 2005; Calzada y col., 2009), no se retienen los compuestos intermedios de la ruta 4S en el interior de las células, como ocurre en el caso de *R. erythropolis* IGTS8. Es decir, siguiendo los compuestos de la ruta 4S en el caldo o cultivo en *resting cells*, se cierra balance. Esto permite estudiar las actividades de las distintas enzimas que están involucradas en la ruta 4S: DszA, DszB, DszC y DszD. Para ello, se han hecho experimentos con células de *P. putida* KTH2 en *resting cells*, con diferentes sustratos, los compuestos intermedios de la ruta 4S (DBTO, DBTO₂ y HBPS) además de DBT. Estos experimentos se han hecho con células cultivadas a distintos tiempos (5, 10, 15 y 23 h) y distintas condiciones fluidodinámicas (100, 200, 300, 500 y 800 rpm).

6.2. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer del trabajo descrito en esta Memoria son las siguientes:

- **Sobre el crecimiento de la bacteria *Rhodococcus erythropolis***
 1. La velocidad de crecimiento de *R. erythropolis* IGTS8 se ve claramente influida por la agitación a la que se realice dicho crecimiento. La velocidad de crecimiento aumenta cuando se incrementa N, hasta un valor de esta variable de 250 rpm. A mayores agitaciones permanece constante y por encima de 450 rpm la velocidad de crecimiento disminuye. Esto es indicativo de dos situaciones: a valores bajos de la velocidad de agitación, N, existe un control de la velocidad global del proceso por la velocidad de transporte de oxígeno, OTR, mientras que para valores altos de N se detecta un estrés hidrodinámico en el cultivo celular. La situación anterior se puede mostrar cuantitativamente a través del valor de los parámetros (μ , C_x^{\max}) de un modelo cinético simple que se ajusta bien a los resultados experimentales. Así mismo, la conducta antes descrita queda puesta de manifiesto por el valor de un factor de efectividad, η , que aumenta desde un valor de 0,87 hasta un valor igual a 1 cuando la velocidad de agitación lo hace desde 100 hasta 250 rpm; este parámetro se mantiene en dicho valor (1) cuando la velocidad de agitación varía entre 250 y 450 rpm; si se sigue aumentando la velocidad de agitación, el valor de, η disminuye drásticamente pasando de un

valor igual a 1 hasta 0,5 a una $N = 700$ rpm. La influencia de la velocidad de agitación sobre distintos parámetros (η y C_x^{max}), ya comentados, se muestra claramente en las siguientes figuras:



Zona a: Condiciones limitadas por OTR para el crecimiento

Zona b: Condiciones no limitadas por OTR para el crecimiento

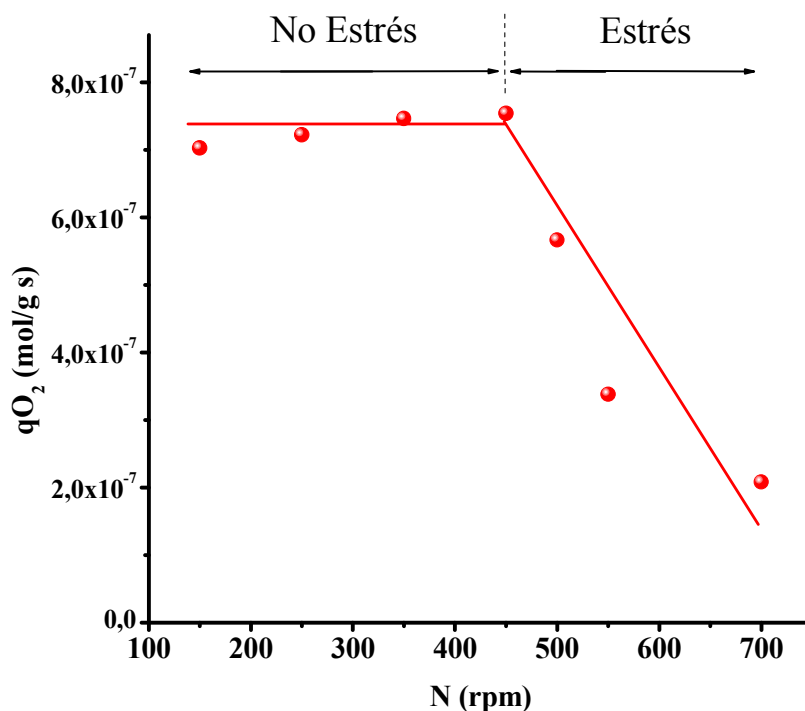
Zona c: Condiciones de estrés por OTR para el crecimiento

- La determinación de OUR por el método dinámico en el cultivo celular, para distintos tiempos de crecimiento, permite calcular q_{O_2} , que presenta una evolución respecto a la concentración celular lineal y decreciente, como predice el modelo cinético empleado para describirlo. Este parámetro muestra una variación similar a los parámetros citados en el punto anterior, por lo que puede ser utilizado como un parámetro característico para poner de manifiesto el control de la OTR ($OTR < OUR$), para agitaciones por debajo de 250 rpm, o bien una situación de control metabólico (en la que $OTR \geq OUR$), para agitaciones entre 250 y 450 rpm, y, por último, una situación de estrés, cuando dicho parámetro disminuye a partir de ciertos valores de la agitación, en este caso para valores de $N > 450$ rpm.

El número de *Damköhler* (Da) modificado es otra forma de indicar las mismas situaciones. Los valores de este número adimensional confirman que para agitaciones bajas, entre 100 y 250 rpm, la resistencia a la transferencia de oxígeno es claramente la etapa limitante de la velocidad de crecimiento y de la velocidad de consumo. Cuando las condiciones de operación son velocidades de agitación iguales o superiores a 250-300 rpm, no hay limitación por transporte.

Cuando la velocidad de agitación se sitúa por encima de 450 rpm, el descenso observado tanto en η como en q_{O_2} , viene determinado por el hecho de que las células son afectadas por las fuerzas hidrodinámicas del sistema y no por una insuficiente OTR

3. El caudal de aire, estudiado en este trabajo entre 1 y 10 L/min, apenas genera diferencias en la velocidad de crecimiento y de consumo de oxígeno. Por lo tanto, en estas condiciones, la velocidad de transporte no está controlando la velocidad global del proceso y, además, no parece suponer un origen de estrés para las células, ya que no se detecta ningún cambio significativo tampoco a valores altos de esta variable.
4. Como consecuencia de todo lo anterior, se ha propuesto un método rápido para determinar las condiciones fluidodinámicas que afectan a un cultivo bacteriano. Este método consiste en medir el consumo específico, q_{O_2} , y comprobar su variación en función de las condiciones fluidodinámicas. Como puede apreciarse en la siguiente gráfica, este parámetro no varía con la velocidad de agitación hasta que, llegado un valor, sufre un descenso evidente. Este descenso marca el límite que no debe ser sobrepasado si se pretende no afectar a las células por cualquier tipo de estrés relacionado con las condiciones hidrodinámicas o con la velocidad de transporte de oxígeno.



- **Sobre la capacidad desulfurante acumulada durante el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis***

5. La capacidad desulfurante de las células de *R. erythropolis* IGTS8, determinada en ensayos de *resting cells* con DBT como compuesto modelo, depende del tiempo de crecimiento de las células y de las condiciones fluidodinámicas empleadas durante dicho crecimiento. Así, cuando las células son cultivadas entre 100 y 450 rpm, la capacidad desulfurante aumenta al aumentar la velocidad de agitación (para todas las edades celulares estudiadas); pero dicha capacidad desulfurante presenta una brusca caída cuando el cultivo de las células es realizado empleando una velocidad de agitación mayor de 450 rpm.

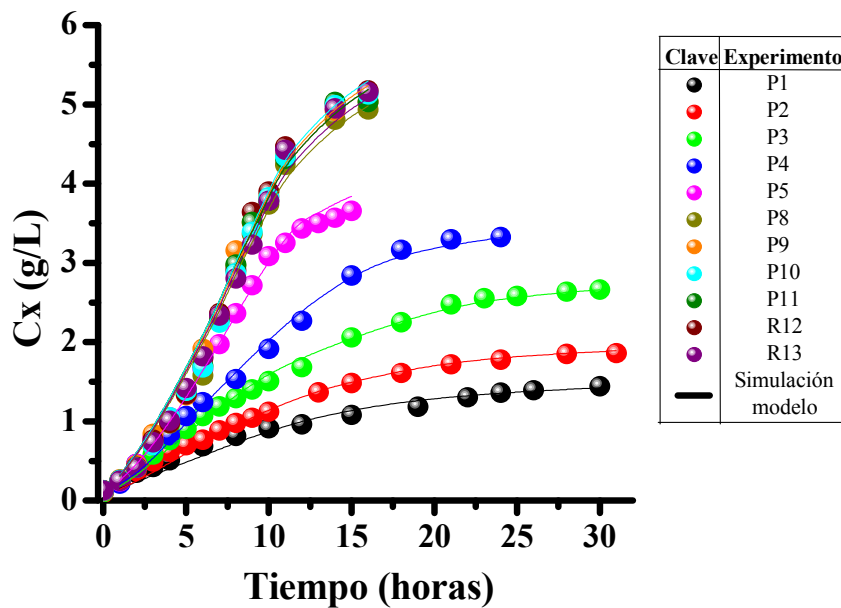
- **Sobre el crecimiento de la bacteria *Pseudomonas putida***

6. El crecimiento de *P. putida* KTH2 está controlado por la velocidad de transporte de oxígeno cuando se emplean bajas velocidades de agitación. A medida que se aumenta la velocidad de agitación desde 100 hasta 600 rpm, la velocidad de crecimiento aumenta. Para velocidades de agitación por encima de 600 rpm, y hasta 2000 rpm, la velocidad de transporte deja de controlar la velocidad de crecimiento, ya que no se ve influida por la citada variable, N. Además, por mucho que aumenta N, hasta el límite físico de los equipos empleados, 2000 rpm, la velocidad de crecimiento no varía. Por lo tanto, se puede afirmar que este microorganismo no presenta, en el intervalo experimental estudiado, efecto alguno debido al estrés hidrodinámico, al menos en su crecimiento.

La medida de diferentes parámetros característicos del crecimiento celular (concentraciones de oxígeno disuelto, de las fuentes de carbono –glicerol y ácido glutámico- y del pH) durante el cultivo del microorganismo, cuando se emplean diferentes velocidades de agitación (desde 100 hasta 2000 rpm), reflejan resultados análogos a los descritos en el punto anterior y ponen de manifiesto que, en dicho intervalo de velocidades de agitación, no existen restricciones fluidodinámicas que puedan producir estrés o daño celular en *P. putida* KTH2.

7. El estudio de la evolución que sigue tanto la concentración de biomasa como otras magnitudes (ya citadas) asociadas al crecimiento de *P. putida* KTH2, bajo las diferentes condiciones fluidodinámicas estudiadas, ponen de manifiesto que dichas células muestran dos tipos de comportamiento muy diferentes, delimitados por la velocidad de agitación que se emplee para el cultivo de las mismas: agitaciones bajas (de 100 a 500 rpm) o altas (de 600 a 2000 rpm).
8. Se ha propuesto un modelo cinético empírico que es capaz de describir satisfactoriamente el crecimiento de *P. putida* KTH2 en ambas situaciones, para todas las condiciones de agitación. La ecuación cinética, así como los datos experimentales de concentración de biomasa frente al tiempo y la predicción proporcionada por el modelo cinético, se muestran a continuación:

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu \cdot C_{O_2}}{K_1 + C_{O_2}} \cdot \frac{C_x}{K_2 \cdot C_{O_2} + C_x}$$



9. La velocidad de consumo específico de oxígeno, q_{O_2} , también es un indicador con este microorganismo de la influencia de las condiciones hidrodinámicas sobre el crecimiento, que marca claramente los dos tipos de comportamientos: por un lado, en condiciones de microaerobiosis, es decir, para el intervalo de velocidades de agitación desde 100 hasta 500 rpm, q_{O_2} alcanza su valor máximo al inicio del crecimiento para luego disminuir de manera hiperbólica respecto a

la concentración celular. Por otro lado, en condiciones no limitantes de oxígeno, es decir, para el intervalo de velocidades de agitación desde 600 hasta 2000 rpm, q_{O_2} presenta una evolución respecto a la concentración celular que es prácticamente lineal y decreciente, un comportamiento esperado y similar al encontrado en el caso de *R. erythropolis*, ya descrito anteriormente.

10. Los resultados experimentales encontrados en el estudio del crecimiento de la bacteria *P. putida* natural indican que esta cepa muestra un comportamiento análogo al observado en la cepa modificada genéticamente, *P. putida* KTH2. A partir de este estudio, se puede concluir que los dos comportamientos observados en el crecimiento de *P. putida* KTH2 no se debe a su condición de GMO, si no, a una especificidad del género *Pseudomonas*, al menos cuando el crecimiento se realiza en el medio y las condiciones de operación empleadas en este estudio.

Sobre la capacidad desulfurante acumulada durante el crecimiento de *Pseudomonas putida* KTH2

11. La capacidad desulfurante que desarrollan las células de *P. putida* KTH2 durante su crecimiento no se ve influida cuando dichas células son cultivadas con una velocidad de agitación entre 100 y 300 rpm. Sin embargo, cuando el crecimiento de *P. putida* KTH2 se lleva a cabo empleando velocidades de agitación más altas, desde 500 rpm, la capacidad desulfurante disminuye notablemente.
12. Las actividades enzimáticas intracelulares de la ruta 4S, medidas en *Pseudomonas putida* KTH2, muestran un comportamiento diferente según se trate de las monooxigenasas DszC y DszA o de la desulfinaasa DszB, dependiendo de la edad celular y de las condiciones hidrodinámicas empleadas para el cultivo de las células.

Las enzimas monooxigenasas DszC y DszA (que catalizan las dos primeras y la tercera reacción de la ruta 4S, respectivamente) muestran valores de actividad muy similares a lo largo del crecimiento para agitaciones bajas (100, 200 y 300 rpm), alcanzando su máximo valor, de 0,7 $\mu\text{M/g}\cdot\text{min}$, a edades celulares más tardías del crecimiento. Por el contrario, a velocidades de agitación más altas

(500 y 800 rpm), las actividades de estas enzimas presentan una brusca caída, alcanzando valores máximos significativamente más bajos, en torno a 0,2-0,3 y 0,1-0,15 $\mu\text{M/g}\cdot\text{min}$, respectivamente.

La enzima DszB o desulfinasas, que cataliza la última reacción de la ruta 4S, muestra los valores de actividad máximos a edades celulares tempranas del crecimiento, esto es, alrededor de las 5 horas. La influencia de las condiciones hidrodinámicas en la actividad de esta enzima es muy significativa, ya que el valor más alto de actividad de la enzima DszB es el obtenido con células cultivadas a 100 rpm (0,321 $\mu\text{M/g}\cdot\text{min}$); a partir de esta agitación, la actividad enzimática se ve reducida de forma gradual con el aumento de la velocidad de agitación. Esta enzima, DszB, es, por tanto, la enzima cuya actividad se ve más afectada y en condiciones fluidodinámicas menos severas de todas las que participan en la ruta 4S

6.3. BIBLIOGRAFIA

Alcon, A.; Santos, V.E.; Martin, A.B.; Yustos, P. y Garcia-Ochoa, F. **2005**. Biodesulfurisation of DBT with *Pseudomonas putida* CECT5279 by resting cells: Influence of cell growth time on reducing equivalent concentration and HpaC activity. *Biochem. Eng. J.* **26**, 168-175.

Çalik, P.; Yilgör P.; Ayhan P. y Demir A.S., **2004**. Oxygen effects on benzaldehyde lyase production. *Chem. Eng. Sci.* **59**, 5075–5083.

Calzada, J.; Zamarro, M. T.; Alcon, A.; Santos, V. E.; Diaz E.; Garcia J. y Garcia-Ochoa F., **2009**. Analysis of Dibenzothiophene Desulfurization in a Recombinant *Pseudomonas putida* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 875-877.

Garcia-Ochoa, F. y Gomez, E., **2005**. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 771-772.

Garcia-Ochoa, F. y Gomez E., **2010**. Oxygen transfer rate determination: chemical, physical and biological methods. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.* 1-21.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez E.; Santos, V. E. y Merchuk, J.C., **2010**. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* **49**, 289-307.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E.; Alcon, A. y Santos, V. E., **2013**. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* **36**, 911-925.

Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., **2006a**. Oxygen-Uptake and Mass-Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on biodesulfurization (BDS) capability. *Energy fuels.* **20**, 1565-1571.

Gomez, E.; Santos V.; Alcon, A.; Martin A.B. y Garcia-Ochoa F., **2006b**. Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability, *Chem. Eng. Sci.* **61**, 4595-4604.

Martin A.B.; Alcon A.; Santos V.E. y Garcia-Ochoa F., **2004**. Production of a Biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy Fuels.* **18**, 851-857

Martin, A. B.; Alcon A.; Santos V. y Garcia-Ochoa F., **2005**. Production of a biocatalyst of *Pseudomonas putida* CECT5279 for DBT biodesulphurization: influence of the operational conditions. *Energy Fuels.* **19**, 775-782.

Merchuk, J.C., **1991**. Shear effects on suspended Cells. *Advances Bio. Eng.* **44**, 65, 1-31.

Olmo, C.H.; Santos, V.E.; Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005a**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of media composition. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 157-166.

Olmo, C.H., Santos, V.E., Alcon, A. y Garcia-Ochoa, F., **2005b**. Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulphurization: influence of operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **22**, 229-237.

CAPÍTULO 7.
NOMENCLATURA

CAPÍTULO 7

NOMENCLATURA

A	Área de pico en cromatograma (UA·min).
a	Área interfacial específica (m^{-1}).
Abs	Absorbancia (UA).
ATP	Adenosina trifosfato.
b	Ancho de la pala en el agitador (cm).
BDS	Biodesulfuración.
BSM	Basal Salt Medium.
C_{AG}	Concentración de ácido glutámico (g/L).
C_{DBT}	Concentración de dibenzotiofeno (μM).
C_G	Concentración de glicerol (g/L).
$C_{Int/ext}$	Concentración de los compuestos intermedios de la ruta 4S intra o extracelulares - DBTO, DBTO ₂ y HBPS - (μM).
C_{HBP}	Concentración de hidroxibifenilo (μM).
C_j	Concentración del compuesto j (mM).
C_{O_2}	Concentración de oxígeno disuelto (mol/L).

$C_{O_2}^*$	Concentración de oxígeno disuelto en condiciones de saturación (mol/L).
C_s	Concentración de sustrato (g/L).
C_x	Concentración de biomasa (g/L).
d	Factor de dilución.
D	Diámetro del tanque (cm).
DBT	Dibenzotiofeno.
DBTO	Dibenzotiofeno sulfóxido.
DBTO ₂	Dibenzotiofeno sulfona.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
Da	Número modificado de <i>Damköhler</i> (-).
d_b	Diámetro de burbuja (m).
d_c	Diámetro medio de la célula (m).
D_L	Difusividad en el líquido (m^2/s).
d_h	Altura de los tabiques deflectores (cm).
<i>dszA</i>	Gen que codifica la proteína DszA, dentro del operón <i>dszABC</i> .
<i>dszB</i>	Gen que codifica la proteína DszB, dentro del operón <i>dszABC</i> .
<i>dszC</i>	Gen que codifica la proteína DszC, dentro del operón <i>dszABC</i> .
DszA	Segunda enzima monooxigenasa de la ruta 4S.
DszB	Enzima desulfinaasa de la ruta 4S que cataliza la transformación de HBPS en HBP.
DszC	Primera enzima monooxigenasa de la ruta 4S.
DszD	Enzima flavin: NADH reductasa presente en <i>R. erythropolis</i> IGTS8.
E_{cc}	Energía de colisiones célula-célula (J).

E_{ca}	Energía de colisiones célula-agitador (J).
F	F de Fischer, parámetro estadístico.
F_c	Factor de calibrado.
FMN	Mononucleótido de flavina.
$FMNH_2$	Mononucleótido de flavina reducido.
g	Constante gravitacional (m/s^2).
h	Altura del líquido (cm).
He	Constante de Henry ($mol/m^3 \cdot atm$).
h_i	Distancia entre la punta de la varilla de agitación y la base interna de la vasija (cm).
HBP	2-hidroxibifenilo.
HBPS	2-(2-hidroxibifenil)-bencenosulfonato (sulfonato).
HDS	Hidrodesulfuración.
HpaC	Enzima flavin: NADH oxidorreductasa, presente en <i>P. putida</i> KTH2.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).
J_0	Densidad de flujo molar ($mol_{O_2}/m^2 \cdot s$).
k	Índice de consistencia ($Pa \cdot s^n$).
K	Coefficiente global de transferencia de materia (m/s).
K_1	Constante cinética empleada en la Ec. [4.3] (g/L).
K_2	Constante cinética empleada en la Ec. [4.3] (g/L).
k_L	Coefficiente de transferencia de materia (m/s).
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferencia de materia (s^{-1}).

K_S	Constante de saturación del modelo de Monod (g/L).
LB	Medio de crecimiento complejo Luria-Bertani.
m_{O_2}	Coefficiente de consumo de oxígeno para el mantenimiento (mol/g·s)
n	Índice de flujo (-).
N	Velocidad de agitación (rpm).
NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida y adenina.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido.
N_p	Número adimensional de potencia (-).
OD	Oxígeno disuelto.
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno (<i>Oxygen Transfer Rate</i>) (mol/L·s).
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno (<i>Oxygen Uptake Rate</i>) (mol/L·s).
P_G	Presión parcial de oxígeno en la burbuja de gas (Pa).
$p_{O_2}^*$	Presión de oxígeno en el equilibrio con la fase líquida (Pa).
Q	Caudal de gas (L/min).
q_{O_2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno (mol/g·s).
SRC	Suma de residuos al cuadrado.
T	Diámetro del agitador (cm).
t_e	Tiempo de exposición (s).
T_s	Distancia entre la base interna de la vasija y la turbina inferior (cm).
u	Velocidad de fluctuación (m/s).
UA	Unidades de absorbancia.
V	Volumen (L).

ν	Viscosidad cinemática (m^2/s).
V_s	Velocidad superficial del gas (m/s).
v_{tip}	Velocidad típica del agitador (m/s).
w	Altura de la pala en el agitador (cm).
w_j	Peso de los residuos.
X_{DBT}	Grado de conversión del DBT (%).
X_{HBP}	Rendimiento de desulfuración (%).
$Y_{x/j}$	Rendimiento macroscópico de la fuente de carbono en biomasa (g/g), donde j = glicerol, ácido glutámico.
Y_{xO}	Rendimiento macroscópico de oxígeno en biomasa (g/g).
Y_{xS}	Rendimiento macroscópico de sustrato en biomasa (g/g).

Letras griegas

α, β	Parámetros de la Ec. [2.16] y [3.18] Parámetros definidos en las Ecs. [3.19]. y [3.20], respectivamente.
τ	Cizallamiento o esfuerzo cortante (<i>shear stress</i>) (N/m^2).
τ_0	Tensión umbral o crítica de flujo (N/m^2).
γ	Velocidad de deformación o gradiente de velocidad (<i>shear rate</i>) (s^{-1}).
σ	Tensión superficial (N/m).
\emptyset	Fracción volumétrica de gas en el líquido (<i>hold-up</i>) (-).
μ	Viscosidad (Pa·s). Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
μ^*	Velocidad específica máxima de crecimiento sin limitación (h^{-1}).

μ_{ap}	Viscosidad aparente ($Pa \cdot s$).
μ_c	Viscosidad en el modelo de Casson ($Pa \cdot s$).
μ_m	Parámetro cinético del Ec. [3.1] ($L/\mu\text{mol/h}$).
η	Factor de efectividad para el crecimiento (-). Longitud del remolino (m).
ε	Velocidad de disipación de energía por unidad de masa (W/kg).
ρ	Densidad (kg/m^3).

Subíndices

c	Referido a la célula.
d	Referido al método dinámico de medida de OUR.
G	Referido al gas.
i	Referido a la interfase gas-líquido
L	Referido al líquido.
max	Referido al valor máximo.
p	Referido al método en proceso de medida de OUR.

Superíndices

*	Relativo a la saturación.
0	Referido al tiempo cero, valor inicial.
t	Referido al tiempo t.
exp	Referido al valor experimental.
max	Referido al valor máximo.
teo	Referido al valor teórico.