



Universitat Autònoma de Barcelona
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Departament d'Enginyeria Química

CULTIVO EN BIORREACTORES DE
Rhodospirillum rubrum
EN CONDICIONES FOTOHETEROTRÓFICAS

FERNANDO CABELLO BERGILLOS

Tesis doctoral

Julio de 2007

Francesc GÒDIA i CASABLANCAS, Catedràtic d'Enginyeria Química i Joan ALBIOL i SALA, Professor agregat, del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEM: Que l'enginyer químic Fernando CABELLO BERGILLOS ha dut a terme amb la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, el treball que amb el títol "**Cultivo en biorreactores de *Rhodospirillum rubrum* en condiciones fotoheterotróficas**" es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per a optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant l'Escola de Postgrau de la Universitat Autònoma de Barcelona aquesta tesi, signant la present certificació a Bellaterra, el 22 de maig de 2007.

FRANCESC GÒDIA I CASABLANCAS

JOAN ALBIOL I SALA

A la memoria de mi padre,

ASTROBIOLOGIA

A Joan Oró,

Admirem aquest
Sostre d'estels,
Tot l'espai
Rere cada interrogant mut
On trobem nous planetes.
Busquem les veus invisibles,
Infinits anhels,
Òrbites on poder
Localitzar el desig de l'etern,
On poder mirar
Galàxies que enyorem, l'Ésser
Intel·ligent que ens
Atreu d'ençà el nostre origen.

Assumpció Forcada

Agraïments

Aquest treball, el qual m'ha format no només des de la vessant estrictament científica, no hauria estat possible sense l'ajuda inestimable de molta gent, i ara que això ja pren forma, ha arribat el moment de reconèixer la seva gran o petita contribució.

Primerament, vull agrair a en Quico haver-me donat la possibilitat de realitzar aquest treball, haver-me recolzat quan s'han presentat dificultats i per haver-me dedicat el seu temps, malgrat les seves nombroses responsabilitats.

I would like to thank Christophe Lasseur and the *European Space Agency* for allow me to carry out my PhD Thesis working in the MELISSA Project.

Un pilar fonamental en aquest treball ha estat en Joan, el qual m'ha dedicat incondicionalment el seu temps i amb una paciència incommensurable m'ha anat ensenyant i m'ha ajudat sempre que ha estat necessari. M'ha transmès l'interès pel coneixement i per anar interpretant la realitat tal i com se'ns presenta. Potser una de les millors coses que me'n duc d'aquest treball, és la seva amistat.

Certament, aquest treball no només és meu, si no que una petita part també és de la Vanessa i d'en Dani pel seu suport al laboratori.

También debo agradecer de forma especial a mi padre y a mi madre su apoyo, esfuerzo y entusiasmo para que este trabajo algún día viese la luz. Me duele profundamente no haberlo acabado en vida de mi padre, por la especial ilusión que este trabajo le hacía a él. Si desde algún sitio me puede ver, estoy seguro que estará muy contento y orgulloso.

També li vull donar les gràcies a la Laura pel seu recolzament incondicional i la seva comprensió en la fase final d'aquest treball, probablement la de més nervis. Ha tingut molta paciència compartint-me amb "la MELISSA" i ha renunciat a alguna escapada que altra per tal de que aquest treball no es veiés afectat. Per tot això i per ser com és li dono mil milions de gràcies.

A Julio debo agradecerle los consejos que me ha dado dentro y fuera del laboratorio. Es un magnífico compañero y un excelente amigo. La verdad es que en todos y cada uno de los buenos recuerdos que me llevo de mi experiencia en el MELISSA, en todos, aparece él. Su amistad es otro de los «éxitos colaterales» de este trabajo.

A l'Oriol, company de pràctiques des de l'inici de la carrera, de nervis durant el projecte, de doctorat i d'inexperiència quan tots dos vam començar a donar classes, li agraeixo la seva amistat, la qual no m'agradaria perdre mai. Espero que el doctorat no sigui l'últim que fem plegats, perquè realment és un plaer treballar al seu costat.

No em puc deixar ni al Ramon ni a la Gemma, als quals li haig d'agrair tots els bons moments viscuts amb ells i amb l'Oriol. Sens dubte, el millor de la carrera és l'amistat amb ells quatre, la qual no es pot perdre mai.

También me gustaría agradecer a mis hermanos su ayuda y apoyo mostrado durante todo el tiempo que ha durado este trabajo, al igual que a Saida, quien lo ha seguido de cerca desde el principio.

L'Ernest, que és simplement el Rei, tampoc me'l puc descuidar, qui ha viscut l'història de "la MELISSA" de bastant aprop, m'ha donat en tot moment el seu suport i ha contribuït de manera singular a que els pocs moments d'oci, fossin aprofitats totalment. En David, el meu relacions públiques número 1, també és molt responsable d'això últim. Millor passar per alt el concepte que ell, conjuntament amb la Gabriella, la Sandra i l'Alberta, tenien del MELISSA.

También me gustaría agradecer a Julián, alias «el Reque», la ayuda prestada no sólo en el contexto de este trabajo, y los buenos momentos vividos junto a él y Julio.

Durant el temps que ha durat aquest treball, he tingut molt bons companys i amics, tant dins del grup d'investigació (l'Anne, la Núria, l'Anna i la Sandra) com al Departament (no cito a cap per no descuidar-me a ningú). Gràcies a tots per haver format un bon clima de treball i haver fet que el dia a dia fos agradable.

Finalment, i no per això menys important, li haig de donar les gràcies pel seu suport a tots els meus companys i amics del Consell en general i, especialment, a en Leandro i la Mercè (dos dels tres integrants del «*Dream Team*»), els quals han patit amb mi la recta final d'aquest treball i m'han donat moltes facilitats i ànims. Gràcies per tot.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Sistemas de soporte de vida	13
1.1.1. Clasificación de los sistemas de soporte de vida	16
1.1.2. Selección de un sistema de soporte de vida	18
1.1.3. Sistemas de soporte de vida fisicoquímicos	20
1.1.4. Sistemas de soporte de vida biológicos	21
1.1.5. Evolución de los sistemas ecológicos cerrados de soporte de vida	24
1.2. El proyecto MELISSA	28
1.2.1. Descripción de los compartimentos	31
1.2.2. El sistema de control del bucle MELISSA	44
1.2.3. La planta piloto	47
1.3. El compartimento II	51
1.4. Rhodospirillum rubrum	55
1.4.1. Metabolismo del Carbono	57
1.4.2. Metabolismo del Nitrógeno	68
1.4.3. Asimilación de Fósforo y Azufre	71
1.4.4. Metabolismo energético	72
1.4.5. Biosíntesis de macromoléculas	77
1.4.6. Metabolismo de reserva	84
1.5. Transmisión de la radiación	93
1.5.1. Conceptos básicos de radiación. Magnitudes y unidades.	93
1.5.2. Modelos de transmisión de la radiación	99
2. OBJETIVOS	101

3. MATERIALES Y MÉTODOS 103

3.1. Cepa utilizada, condiciones y medios de cultivo _____ 103

3.1.1. Medio revitalizador _____ 105

3.1.2. Medios de cultivo de los experimentos realizados en los
fotobiorreactores _____ 1063.1.3. Medio de cultivo de los experimentos realizados en las botellas
Roux _____ 107**3.2. Fotobiorreactores utilizados _____ 108**

3.2.1. Fotobiorreactor escala laboratorio _____ 108

3.2.2. Fotobiorreactor escala piloto _____ 110

3.3. Procedimientos analíticos _____ 114

3.3.1. Determinación de la concentración de células _____ 114

3.3.2. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles _____ 115

3.3.3. Determinación del contenido total de carbohidratos _____ 117

3.3.4. Determinación del contenido de lípidos _____ 119

3.3.5. Determinación del contenido de proteínas en la biomasa _____ 119

3.3.6. Determinación del contenido de DNA _____ 121

3.3.7. Determinación del contenido de RNA _____ 122

3.3.8. Determinación del contenido de poli- β -hidroxialcanoatos (PHAs) _____ 124

3.3.9. Determinación del contenido de glicógeno _____ 125

3.3.10. Determinación de la composición elemental de la biomasa _____ 125

3.4. Calibraciones _____ 127

3.4.1. Irradiancia incidente _____ 127

3.4.2. Concentración de azul dextrano _____ 132

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 134

**4.1. Estudio de la influencia de la naturaleza de la fuente de
luz en el crecimiento de *R. rubrum* _____ 134**

4.1.1. Introducción _____ 134

4.1.2. Equipo experimental _____ 136

4.1.3. Resultados y discusión _____ 140

4.1.4. Conclusiones _____ 155

4.2. Estudio de la influencia de la intensidad de la radiación en el crecimiento de <i>R. rubrum</i>	157
4.2.1. Introducción	157
4.2.2. Resultados y discusión	158
4.2.3. Conclusiones	171
4.3. Estudio de la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de <i>R. rubrum</i>	174
4.3.1. Introducción	174
4.3.2. Resultados y discusión	174
4.3.3. Balance de carbono	197
4.3.4. Conclusiones	214
4.4. Adecuación de un fotobiorreactor piloto para el cultivo de <i>R. rubrum</i> en condiciones fotoheterotróficas	216
4.4.1. Introducción	216
4.4.2. Descripción general del fotobiorreactor	216
4.4.3. Modificaciones necesarias en el fotobiorreactor	218
4.4.4. Experimentos a escala piloto	230
4.4.5. Conclusiones	235
4.5. Estudio del metabolismo celular en relación a su efecto sobre la estabilidad del cultivo	236
4.5.1. Introducción	236
4.5.2. Análisis macromolecular y elemental de las células	236
4.5.3. Análisis de consistencia de los datos experimentales: reconciliación del análisis macromolecular con el análisis elemental.	243
4.5.4. Análisis de los resultados	250
4.5.5. Conclusiones	256
4.6. Modelización del crecimiento de <i>R. rubrum</i> utilizando ácido acético como fuente de carbono	258
4.6.1. Objetivos del modelo	258
4.6.2. Ecuación de propagación de la radiación. Aproximaciones y parámetros utilizados.	259
4.6.3. Cálculo de la irradiancia local	262
4.6.4. Determinación y ajuste de los parámetros	263

Índice

4.6.5.	Calibración del modelo_____	267
4.6.6.	Aplicación del modelo a los experimentos en discontinuo en fotobiorreactores_____	277
4.6.7.	Aplicación del modelo a los experimentos en continuo en fotobiorreactores_____	283
4.6.8.	Explotación del modelo _____	286
4.6.9.	Conclusiones _____	290

4.7. Diseño de un fotobiorreactor piloto _____ 291

4.7.1.	Introducción_____	291
4.7.2.	Dimensionado del Compartimento II dentro del bucle MELISSA ____	291
4.7.3.	Diseño del fotobiorreactor piloto del Compartimento II _____	299
4.7.4.	Dimensionado y diseño de los equipos auxiliares _____	313
4.7.5.	Instrumentación y diseño de los lazos de control _____	315
4.7.6.	Sistema de esterilización del fotobiorreactor_____	325

5. CONCLUSIONES 327

6. ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA 330

6.1.	Abreviaturas_____	330
6.2.	Nomenclatura_____	331

7. REFERENCIAS 334

8. ANEXOS 351

8.1.	Diagrama de ingeniería (PID) del Compartimento II ____	351
------	--	-----

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas de soporte de vida

El término soporte de vida fundamentalmente hace referencia a todas las técnicas disponibles que permiten mantener la vida en un ambiente o situación en la cual el cuerpo humano sería incapaz de mantener sus funciones vitales sin ayuda externa. Por tanto, su objetivo se centra en desarrollar aquellas prácticas necesarias que hacen posible la vida del ser humano en una atmósfera hostil. El soporte de vida en el Espacio parte de las técnicas de soporte de vida practicadas en barcos (proporcionando alimento y agua fresca), estaciones en los polos terrestres (proporcionando alimentos y energía) y submarinos (proporcionando alimentos, aire y agua).

Actualmente, una de las aplicaciones por las cuales los sistemas de vida se están desarrollando es para un uso en el Espacio, manteniendo las condiciones necesarias

para la supervivencia de la tripulación en misiones espaciales. Las aportaciones necesarias para mantener la vida de la tripulación son oxígeno, agua y alimento. Por otro lado, también es necesario deshacerse convenientemente de los residuos que se van generando a bordo, que principalmente son de dióxido de carbono, orina y heces.

Las agencias espaciales están planificando para un futuro no muy lejano misiones de más larga duración y envergadura, en concreto a la Luna y a Marte. A medida que se incrementa el número de tripulantes y se prolonga la duración de la misión también aumentan los requerimientos del sistema de soporte de vida.

Un sistema completamente cerrado, como un trasbordador espacial, puede teóricamente funcionar mientras las provisiones iniciales no se hayan agotado y los residuos generados se vayan almacenando o eliminando. Se ha calculado (Gitelson, 1975) que un sistema de este tipo, para una misión de 3 personas y un mes de duración, requeriría que el peso neto de los productos almacenados fuese alrededor de 630 kg; cantidad que no supone ningún problema para la tecnología aeroespacial actual. Pero, a medida que la duración de la misión se va alargando y se va incrementando el número de tripulantes, el peso de las provisiones necesarias también aumenta. Así, para el mantenimiento de la vida de 5 personas, para un período de más de 3 años, el peso neto de los productos almacenados excedería las 37 toneladas, de las cuales casi 5 toneladas sólo serían oxígeno. Otras fuentes, (MacElroy, 1989) estiman la carga en 43 kg por persona y día, que en los ejemplos anteriores constituirían un peso de 3.8 y 235 toneladas respectivamente. Mientras que para una misión de larga duración las provisiones se deberían almacenar antes de que despegue el trasbordador, una base planetaria habitada dependería del abastecimiento periódico de estos recursos.

En el caso de misiones de larga duración utilizando trasbordadores, su coste sería muy elevado y su viabilidad estaría seriamente amenazada por el hecho de que las provisiones deberían de estar acumuladas en el trasbordador desde el inicio de la misión. En el segundo caso, el de la base planetaria, el hecho de tener que confiar en el abastecimiento periódico de las provisiones no sólo incrementaría el coste de la misión sino que también disminuiría la seguridad de la base, amenazada hasta la llegada de la siguiente partida de provisiones.

Estas restricciones juntamente con la necesidad de crear un entorno apropiado y saludable para mantener la vida humana durante largos períodos de tiempo fuera de la Tierra, fuerzan a buscar maneras de establecer "centros de vida auto-sostenidos".

Esto aseguraría una verdadera opción para que el hombre pudiese abandonar la biosfera terrestre y crear posibilidades reales para la supervivencia de las personas fuera de la Tierra de duración ilimitada.

Los problemas que aparecen cuando se considera el confinamiento permanente del hombre en el Espacio no son exclusivos de este sistema, si no que son comunes a otros sistemas, como podría ser el caso de una base permanente en los polos norte o sur o una base submarina bajo el océano. Incluso cuando se considera la misma Tierra entera se pueden esperar problemas del mismo tipo. A medida que la población humana aumenta, la demanda de comida y fibra obliga a que la agricultura sea cada vez más especializada en unas pocas especies de plantas, dedicadas a mantener unas pocas especies de animales, entre los cuales estaría la raza humana. Se podría imaginar el planeta poblado hasta el máximo, donde sólo las especies más productivas de plantas podrían equilibrar la sobrecarga de personas. El resultado de una población humana en constante expansión es el cambio de las condiciones de vida del planeta a las condiciones que habría en un asentamiento espacial. A menos que la humanidad controle este hecho, se deberían abordar los mismos problemas en la Tierra que los que aparecen en el Espacio (Krauss 1979).

Además del aumento de la población, la elevada destrucción de materia orgánica y la combustión de grandes cantidades de combustibles fósiles, con su conversión a dióxido de carbono, juntamente con el indiscriminado uso de compuestos de nitrógeno y fósforo como componentes de los fertilizantes para las plantas, sobrecargan las capacidades naturales de reciclado del propio planeta. Así pues, parece evidente que a largo plazo, los avances que se consigan en el desarrollo de sistemas de soporte de vida en el Espacio, podrán tener una aplicación también a nivel terrestre.

En todos estos casos, el estudio de los ciclos de materia y la implementación de sistemas cerrados en un porcentaje elevado, deberán jugar un papel cada vez más importante en la actividad humana. La implementación de estos ciclos en el Espacio permitirá la conversión de los residuos en materiales de primera necesidad. El atractivo de esta idea lleva a la evaluación de los potenciales sistemas regenerativos. Entre estos tipos de sistemas, sólo aquellos que estén basados en entes biológicos podrán, no sólo satisfacer las necesidades de regeneración del aire y recuperación del agua y de los materiales sólidos, sino que también serán capaces de cerrar el ciclo alimenticio, mediante la generación de materia comestible.

Así pues, una visión general de los requerimientos de los sistemas de soporte de vida se presenta en la figura 1.1.

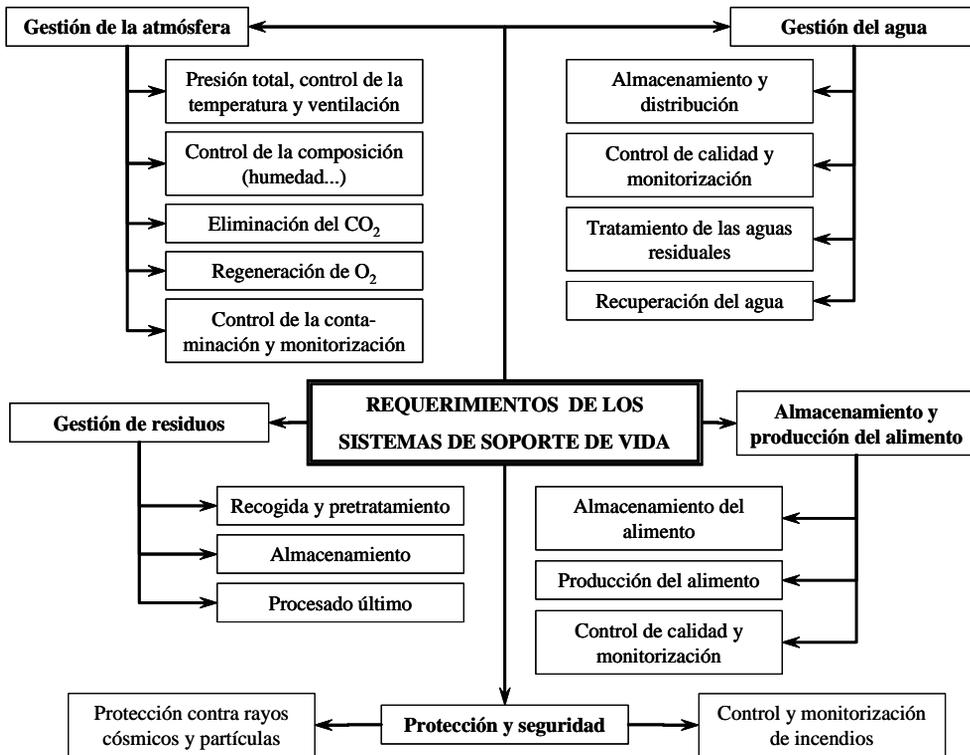


Figura 1.1: Estructura de un ecosistema cerrado artificial (adaptado de Tamponnet y Savage, 1994)

1.1.1. Clasificación de los sistemas de soporte de vida

Los sistemas de soporte de vida en el Espacio se pueden clasificar en dos categorías principales:

- *Los sistemas no regenerativos.* Son aquellos que no incluyen ningún tipo de reciclado, como por ejemplo los sistemas que controlan la presión interior, eliminado el gas hacia el Espacio exterior.

- *Los sistemas regenerativos.* Son aquellos que utilizan ciertos elementos susceptibles de ser reciclados como el oxígeno, el agua y el alimento.

Los sistemas potencialmente regenerativos, pero que no integran esta capacidad de reciclado de sus recursos, se denominan abiertos. Por otra parte, aquellos que reciclan totalmente sus recursos, se denominan cerrados.

El hecho de conseguir mayores niveles de reciclado disminuye considerablemente los aportes externos, tal y como puede observarse en la tabla 1.1.

Nivel	Tipo de sistema de soporte de vida	Masa relativa a embarcar (%)
0	Ciclo abierto	100
1	Reciclado de agua	45
2	1 + absorción de CO ₂	30
3	2 + reciclado de O ₂ a partir de CO ₂	20
4	3 + producción de alimentos mediante reciclado de desechos	10
5	4 + eliminación de fugas	5

Tabla 1.1: Reducción de la masa a embarcar en una misión espacial en función del aumento de materias regeneradas (Von Puttkamer, 1987)

Examinando la tabla 1.1, se observa que la reducción del porcentaje de masa a embarcar no varía acusadamente al conseguir producir alimentos a partir de los desechos. Aunque en términos de masa pueda argumentarse que el impacto de regeneración de residuos no es muy significativo en porcentaje (Eckart, 1999), en general estos son considerados indispensables en misiones espaciales de largo recorrido, entre otras razones, por las de tipo psicológico, dado que se juzga necesario para la tripulación observar «el fenómeno de la vida» para conservar un cierto equilibrio mental. Además, tener la capacidad de regenerar los alimentos, significa una mayor autonomía e independencia de los recursos terrestres.

Por otra parte, los sistemas de soporte de vida pueden estar basados en métodos fisicoquímicos o en métodos biológicos, aunque también existen sistemas híbridos que combinan ambos métodos.

Dentro de los sistemas de soporte de vida regenerativos basados en procesos biológicos (también denominados bioregenerativos) es posible diferenciar dos extremos opuestos: los que tienen por objetivo principal la regeneración de la atmósfera y los que tienen por objetivo básico regenerar la producción de alimentos (habitualmente plantas superiores), éstos últimos reciben el nombre de sistemas ecológicos controlados de soporte de vida.

1.1.2. Selección de un sistema de soporte de vida

La selección de un sistema de soporte de vida viene marcada, básicamente, por dos variables: la duración de la misión espacial y la distancia a la Tierra (Tamponnet y Savage, 1994), tal y como se puede apreciar en la figura 1.2.

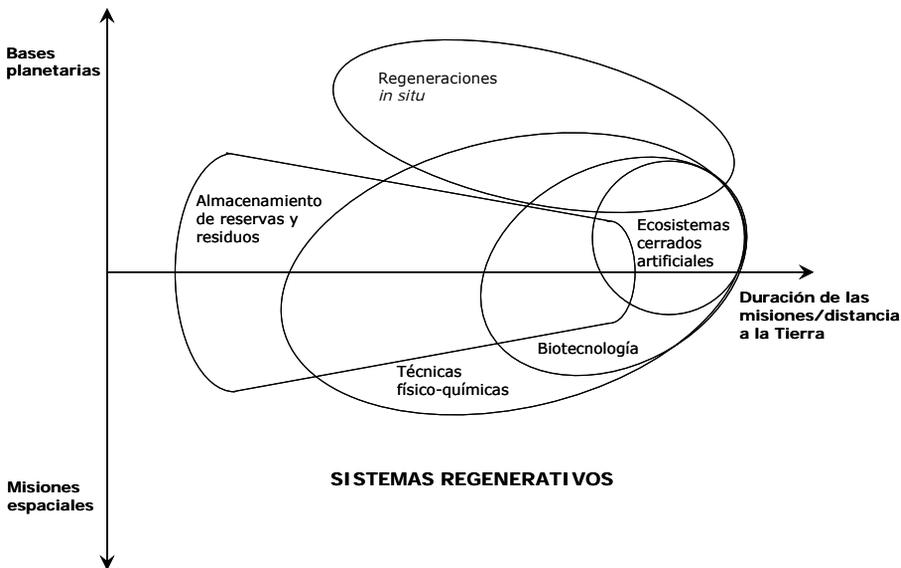


Figura 1.2: Alternativas de sistemas de soporte de vida en el Espacio en función de la duración de la misión y de su alejamiento de la Tierra.

Durante la última década se han desarrollado ciertas conversiones para realizar cálculos y estimaciones sobre la autonomía de las misiones tripuladas, con el objeto de establecer comparaciones entre diferentes sistemas de soporte de vida. Estas conversiones permiten transformar cualquier necesidad de la tripulación en «masa equivalente». Para calcular esta masa equivalente, se puede utilizar la siguiente expresión (Eckart, 1994):

$$\text{Masa equivalente} = \text{Masa del sistema} + \left\{ \begin{array}{l} \text{Cantidad de energía requerida x Factor de conversión} \\ \text{Volumen ocupado x Factor de conversión} \\ \text{Calor requerido x Factor de conversión} \\ \text{Mantenimiento requerido x Factor de conversión} \end{array} \right.$$

Para ejemplificar estos cálculos, si se toma como referencia las estimaciones realizadas por Drysdale (1994), los factores de conversión para el cálculo de la masa equivalente en sistemas de soporte de vida biológicos basados en un cultivo de plantas superiores, son los que se representan en la tabla 1.2.

Requerimiento	Factor de conversión
Superficie de cultivo	69 kg/m ²
Fuente de energía	1/211 kg/kWh (fotovoltaica) 1/369 kg/kWh (solar) 1/3900 kg/kWh (nuclear)
Sistema de refrigeración	1/1590 kg/kWh
Mantenimiento	0.55 kg/hombre-hora

Tabla 1.2: Factores de conversión para conocer la masa equivalente en sistemas de soporte de vida biológicos (plantas superiores, Drysdale, 1994)

Durante 1999 Drysdale *et al.* desarrollaron inicialmente dicha métrica aplicada al denominado «Soporte de Vida Avanzado» para ciertas misiones específicas: la Estación Espacial Internacional (laboratorio orbital de investigación) y para diversos escenarios de una misión a Marte. En la actualidad, dicho "Sistema de Masa Equivalente", ha sido adoptado por los investigadores de las distintas agencias del Espacio (Samsonov, *et al.*, 2000; Osburg y Messerschmid, 2000), como la base

métrica para medir el progreso del «Soporte de Vida Avanzado». De este modo dos sistemas o tecnologías que compitan por una determinada función, pueden tener diferentes requerimientos de masa, volumen, potencia, refrigeración y mantenimiento (Drysdale *et al.*, 2000). Entre estos factores, es interesante remarcar que el tiempo requerido por la tripulación para la operación (mantenimiento) del sistema de soporte de vida es uno de los aspectos más importantes (con mayor impacto) en la determinación de la masa total (Drysdale, 2000).

1.1.3. Sistemas de soporte de vida fisicoquímicos

En este tipo de sistemas el único componente biológico es el hombre. Los procesos fisicoquímicos pueden ser aplicados como solución a una parte de las necesidades de un sistema de soporte de vida, principalmente para:

- La regeneración de la atmósfera
- La recuperación del agua
- El reciclado de los desechos

En cambio estos procesos no biológicos no pueden producir alimento. Todos los sistemas utilizados hasta el momento en misiones tripuladas han sido de tipo fisicoquímico. A continuación se comentan los principales procedimientos disponibles en la actualidad para realizar el tratamiento de la atmósfera, el agua y los desechos mediante procesos fisicoquímicos (Eckart, 1994).

La regeneración de la atmósfera se lleva a cabo mediante tres etapas diferenciadas (Gustavino, 1994 y Eckart, 1994):

- a) *Concentración del CO₂*. Los métodos habituales son el uso de tamices moleculares (zeolitas sintéticas), la concentración por polarización electrónica (en el ánodo se acumula el CO₂), el denominado procedimiento de SWAD (*Solid Amine Water Desorption*) o el uso de hidróxido de litio.
- b) *Reducción del CO₂*. Los métodos comúnmente empleados son: procedimiento Bosch (reacción catalizada a más de 700 °C en presencia de hidrógeno, produciéndose carbono y agua); procedimiento de Sabatier (el dióxido de carbono reacciona con hidrógeno gas en presencia de catalizador en torno a 500 °C, para producir metano y agua); electrólisis del dióxido de carbono

(reducción del dióxido de carbono y producción de oxígeno); utilización de superóxidos.

- c) *Generación de O₂*. Electrólisis simple del agua; electrólisis del agua utilizando como electrolito un polímero conductor; electrólisis en fase gas (se utiliza directamente el aire húmedo de la misma cabina).

En el reciclado de agua pueden distinguirse dos tipos bien diferenciados de procesos fisicoquímicos (Tamponnet *et al.*, 1999):

- a) Métodos basados en procesos de destilación, los cuales se utilizan frecuentemente para el tratamiento de la orina. Los métodos más usuales son: la destilación a presión, la evaporación mediante aire, la evaporación de agua combinada con una oxidación de las impurezas (el amonio se oxida a nitrógeno gas y óxido de dinitrógeno, y los compuestos carbonados a dióxido de carbono e hidrógeno).
- b) Métodos basados en procedimientos de filtración. Son utilizados para generar agua potable y para la higiene, frecuentemente se utilizan para las aguas de condensación. Los principales métodos son: la ósmosis inversa y la electrodiálisis.

Los desechos sólidos son básicamente heces, desperdicios alimenticios, papel y otros posibles residuos orgánicos sólidos provenientes de otros procesos fisicoquímicos. La secuencia que se realiza para el tratamiento de estos residuos es:

- Recogida y separación
- Fraccionamiento
- Estabilización de los productos y/o almacenamiento
- Reciclado (en función de la duración de la misión)

Para su tratamiento se utilizan principalmente los siguientes procesos: oxidación húmeda (a temperatura y presión elevadas, se consume oxígeno y se produce dióxido de carbono, agua, hidrógeno gas y restos inorgánicos); combustión/incineración (oxidación completa de los elementos C, H, O, N, S y P).

1.1.4. Sistemas de soporte de vida biológicos

Los sistemas de soporte de vida biológicos permiten, como ya hacían los sistemas fisicoquímicos, el tratamiento y reciclado de la atmósfera, el agua y los desechos

sólidos. No obstante, los de tipo biológico además también añaden la capacidad de generar materia comestible para la tripulación.

Los principales organismos utilizados en los sistemas de soporte de vida biológicos son microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), algas y plantas superiores.

Microorganismos

Los microorganismos son utilizados habitualmente para el tratamiento de los desechos (desechos sólidos y líquidos de la tripulación, así como partes no comestibles de las plantas).

Las principales ventajas de los sistemas biológicos que utilizan microorganismos son su facilidad de control, que no generan demasiados residuos y acostumbran a tener dinámicas de crecimiento bastante rápidas.

Como contrapartidas, cabe señalar que su biomasa no siempre ser comestible y que, si se cultivan en condiciones aerobias, su cultivo dificulta la regeneración de la atmósfera, puesto que consumen O₂ y desprenden CO₂.

No obstante, en los sistemas de soporte de vida biológicos existen procesos que sólo están al alcance del metabolismo de ciertos microorganismos, por lo que su introducción en estos sistemas es completamente necesaria. Es el caso de la conversión del amonio a nitrato. El aporte básico de nitrógeno dentro de un sistema de soporte de vida se da en forma de amonio procedente de la descomposición de la urea. Pero para el crecimiento de plantas superiores se necesitan las dos formas de nitrógeno, amonio y nitrato, y los únicos organismos capaces de llevar a cabo los pasos de nitrificación para convertir el amonio en nitrato son los microorganismos nitrificantes.

Algas

La investigación de la utilización potencial de algas en sistemas de soporte de vida fue iniciada en los años cincuenta por grandes compañías norteamericanas y soviéticas dedicadas a la investigación espacial y a la aeronáutica (Gitelson *et al.*, 1976). Estos estudios están orientados hacia dos aplicaciones: la regeneración del aire y la utilización con fines alimentarios. Se han realizado estudios para desarrollar métodos de producción de alimento a partir de cultivos de algas en condiciones de

microgravedad (Karen y Kamarei, 1984). Posteriormente, Karen y Nakhost (1989) obtuvieron concentrados proteicos a partir de algas, con un nivel de ácidos nucleicos muy bajo, que se incorporaron a una serie de productos alimenticios, concluyendo que la incorporación de algas a la dieta no representa un problema, pero la cantidad máxima que puede consumirse depende principalmente del grado de purificación de los micronutrientes.

Las principales ventajas de estos organismos son que presentan un crecimiento rápido, un metabolismo controlable y los intercambios de gases son compatibles con las necesidades de la tripulación (regeneración de la atmósfera). Por otro lado, no son suficientes para cubrir las necesidades nutricionales de la tripulación, y tienen un elevado contenido en ácidos nucleicos.

Plantas superiores

Estos organismos presentan una variedad muy importante de elementos nutritivos para el ser humano: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc. Por esta razón, las plantas superiores se introducen como organismos en sistemas ecológicos de soporte de vida con la principal función de aportar alimento a la tripulación.

No obstante, además de esta función, pueden ser utilizadas tanto para la gestión de la atmósfera como para la regeneración del agua. Por otra parte, también proporcionan un ambiente similar al de la Tierra, y esto contribuye al bienestar psicológico de la tripulación, aspecto que se juzga de gran importancia en estancias prolongadas en el Espacio.

Los principales parámetros a tener en cuenta en el estudio y desarrollo de las plantas superiores son la superficie de cultivo, el volumen requerido (altura requerida para el crecimiento de las plantas), la luz (eficiencia, exposición, fotoperiodo), el control de la atmósfera (temperatura, humedad, presión, composición del aire) y los modos de cultivo (semillas, cultivo sobre tierra, cultivo hidropónico, cultivo aeropónico). El sistema que se considera como más adecuado para el cultivo de plantas superiores en el Espacio es el hidropónico (Eckart, 1994).

Para la selección del tipo de plantas a utilizar en un sistema ecológico controlado de soporte de vida se utilizan los siguientes criterios:

- Producción de biomasa
- Necesidades de las plantas y condiciones de crecimiento

- Capacidad de regeneración de la atmósfera
- Capacidad de regeneración de los residuos
- Capacidad de reutilización del agua
- Comportamiento en ambientes extraterrestres
- Interacciones con otros sistemas

A partir de estos criterios, las plantas que se acostumbran a utilizar se dividen en dos grupos. El primero es el que incluye a las especies de plantas superiores que pueden proporcionar un mayor aporte nutricional para el hombre (maíz, arroz, patatas, boniatos, cacahuets, lechuga, soja, remolacha). El segundo grupo está formado por especies que poseen un valor nutritivo bajo pero, en cambio, un valor psicológico elevado (fresas, guisantes, cebollas, brécol) (Wheeler, 1992).

1.1.5. Evolución de los sistemas ecológicos cerrados de soporte de vida

La investigación experimental de sistemas ecológicos de soporte de vida fue iniciada hace ya unas décadas y se ha intensificado en los últimos años, básicamente a causa del interés de las principales agencias espaciales al plantearse como objetivo a medio plazo misiones interplanetarias y viajes espaciales de larga duración, fundamentalmente misiones a la Luna y a Marte.

A continuación se hace una breve descripción de la evolución de los sistemas de soporte de vida ecológicos cerrados:

- En los Estados Unidos de América, en 1961 se realizaron los primeros experimentos con sistemas basados en cultivos de algas con la intención de regenerar el aire, sistema que se mantuvo funcionando durante más de 50 días. En este mismo año, en la Unión Soviética se realizaron experimentos con sistemas del mismo tipo y se utilizaron primero ratas, más tarde perros y finalmente personas humanas (proyectos BIOS 1 y 2).
- En 1977 se desarrolló el proyecto CELSSUS (Japón, USA), que estudiaba un ambiente controlado para el crecimiento de plantas superiores, regulando la luz, las condiciones de humedad, concentración de dióxido de carbono, etc.
- El proyecto BIOS 3 (Unión Soviética, 1972-1984) también utilizó plantas superiores en un sistema cerrado para regenerar el agua y para producir

alimento (30-50% de las necesidades) en un experimento con personas humanas que se prolongó seis meses.

- El proyecto Biosphere 2 (USA, 1984) consistía en un sistema de soporte de vida con un volumen de 18.000 m³; estaba cerrado en lo referente al flujo de materia, pero abierto respecto al de energía. El agua y el aire se regeneraban por completo mediante el sistema ecológico. Ocho personas permanecieron en el sistema durante más de dos años. Cuando concluyó el experimento, el sistema presentaba un significativo descenso en la concentración de oxígeno.
- El proyecto CEEF (*Closed Ecology Experiment Facilities*) se lleva desarrollando desde 1994 por el IES (*Institute for Environmental Science*) en Rokkasyo Village, Japón. Este proyecto está constituido por tres módulos, que pueden funcionar de forma independiente o en cooperación con los otros. Únicamente la energía y la información pueden ser intercambiadas con el exterior del sistema (figura 1.3).

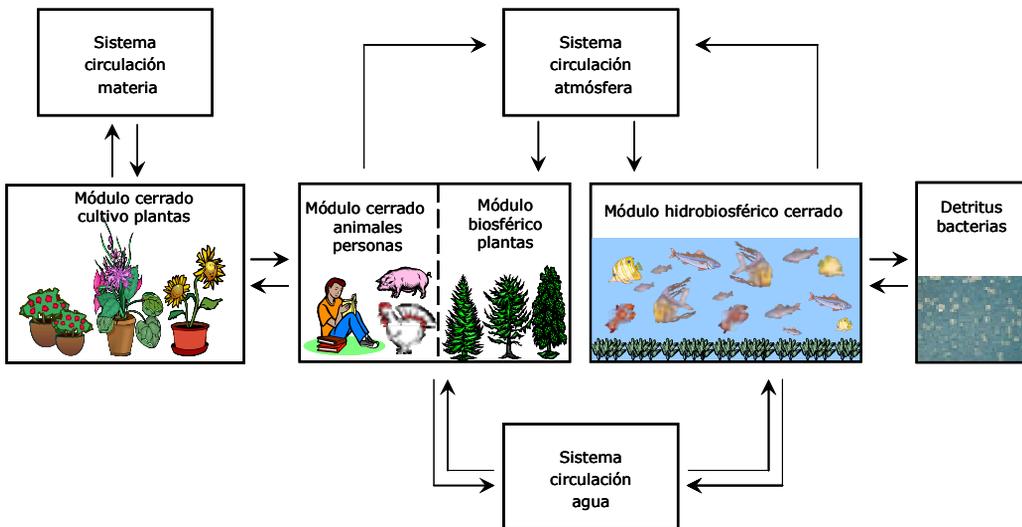


Figura 1.3: Esquema del CEEF (*Closed Ecology Experiment Facilities*) (Kibe et al., 1997)

Así pues, el CEEF representa una importante herramienta para comprender los flujos de materia en la Tierra, así como para desarrollar sistemas de soporte de vida en el Espacio. Los tres módulos que componen este sistema, así como sus funciones, se describen a continuación:

- CPEF (*Closed Plantation Experiment Facility*). Está constituido por cuatro cámaras de cultivo de plantas superiores de tipo hidropónico. El subsistema de tratamiento de residuos clasifica las plantas recogidas en dos grupos: partes comestibles y partes no comestibles. La fracción comestible de las plantas se utiliza como alimento en el siguiente módulo, mientras que la fracción no comestible se trata mediante un proceso de oxidación húmeda.
- CAB & HEF (*Closed Animal Breeding & Habitation Experiment Facility*). Este módulo alberga los experimentos de alimentación tanto animal como humana. Se regula el flujo entre los diferentes subsistemas: tratamiento del aire, del agua y de los residuos.
- CGHEF (*Closed Geo & Hydrosphere Experiment Facility*). Está integrado por dos acuarios, los cuales permiten reconstruir diferentes tipos de ecosistemas marinos. La implementación del sistema se haya en un estado muy avanzado y actualmente se procede a realizar las pruebas de operación con personas (dos «*econautas*»).
- La NASA desarrolló el proyecto LMLSTP (*Lunar Mars Life Support Test Project*) durante los años 1995-1997. Como resultado se realizaron experimentos con un sistema de soporte de vida regenerativo con un grupo de cuatro personas durante noventa días. Durante este periodo de tiempo se regeneró al atmósfera respirable mediante sistemas fisicoquímicos y biológicos (Vodovotz, 1998).
- En la actualidad, la NASA está construyendo una instalación donde se integrarán distintos avances dentro del campo del soporte de vida, dada su estructura modular. Se trata sin duda del mayor esfuerzo en este campo y se denomina BIO-Plex (*Bioregenerative Planetary Life Support System Test Complex*), estando situado en el Johnson Space Center (Houston, USA). No obstante, en la actualidad esta instalación permanece cerrada desde 2001 por falta de presupuesto.

El sistema está compuesto por una serie de módulos interconectados y está dimensionado para experimentar con cuatro personas durante períodos superiores a un año. Utiliza una combinación de plantas superiores, microorganismos y procesos fisicoquímicos para reciclar el agua, producir alimento y procesar los residuos.

- En cuanto a la Agencia Europea del Espacio (ESA), ésta está desarrollando un sistema denominado MELISSA, desde 1989. Dado que el presente trabajo está enmarcado dentro de este proyecto, en el siguiente apartado se describe con más detalle.

1.2. El proyecto MELiSSA

MELiSSA (*Micro Ecological Life Support System Alternative*) ha sido concebido como un sistema de soporte de vida basado en el crecimiento de microorganismos y plantas superiores cuyo objetivo principal es el de profundizar, por una parte, en el estudio del comportamiento de los ecosistemas artificiales y por otra, en el desarrollo de la tecnología necesaria para un sistema biológico de soporte de vida para misiones tripuladas de larga duración, como es el caso de una base lunar o una misión a Marte. Ha sido impulsado desde su concepción por la Agencia Europea del Espacio (ESA) y un consorcio de distintos grupos, y representa en la actualidad la apuesta de la ESA en cuanto a desarrollo de soportes de vida, elemento esencial dentro del programa de exploración del Espacio AURORA (www.esa.int/SPECIALS/Aurora).

El concepto MELiSSA consiste en reciclar todos los residuos producidos por la tripulación (heces, urea, dióxido de carbono, etc.) en biomasa comestible, a la vez que se recupera el agua y se regenera la atmósfera para permitir la respiración humana, utilizando la luz como fuente de energía para la fotosíntesis (Mergeay *et al.*, 1988). Para conseguir este objetivo, se plantea en una primera fase el ensamblaje de seis compartimentos, cuatro de origen microbiológico colonizados por cepas diferentes, uno de plantas superiores que tiene encomendada como función principal satisfacer los requerimientos nutricionales de la tripulación y otro que lo formaría la tripulación. Los seis compartimentos están interconectados de forma que es posible el reciclado de los residuos del compartimento principal (el de la tripulación) y la regeneración de sus nutrientes. En la figura 1.4 se presenta de forma esquematizada la estructura global del concepto MELiSSA, donde se puede apreciar la interconexión de los diferentes compartimentos y los flujos de materia entre éstos.

La ventaja de la base microbiológica de este sistema no sólo reside en la amplia diversidad metabólica y, por tanto, en la posibilidad de seleccionar microorganismos adecuados para la realización de las diferentes funciones; si no que también contribuye a que sea más fácil el estudio y control de sus elementos, lo cual sería más difícil utilizando organismos más complejos.

Una de las características del concepto MELiSSA reside en el hecho de que las diferentes fases de transformación de los residuos en alimento (primero hidrolíticas, después de transformación y finalmente de síntesis) están separadas de forma

individual, por compartimentos. Así, esta aproximación a los sistemas de soporte de vida permite un control directo sobre cada una de las etapas, con la idea de permitir que se traduzca en una operación coordinada y eficiente de todo el sistema en su conjunto.

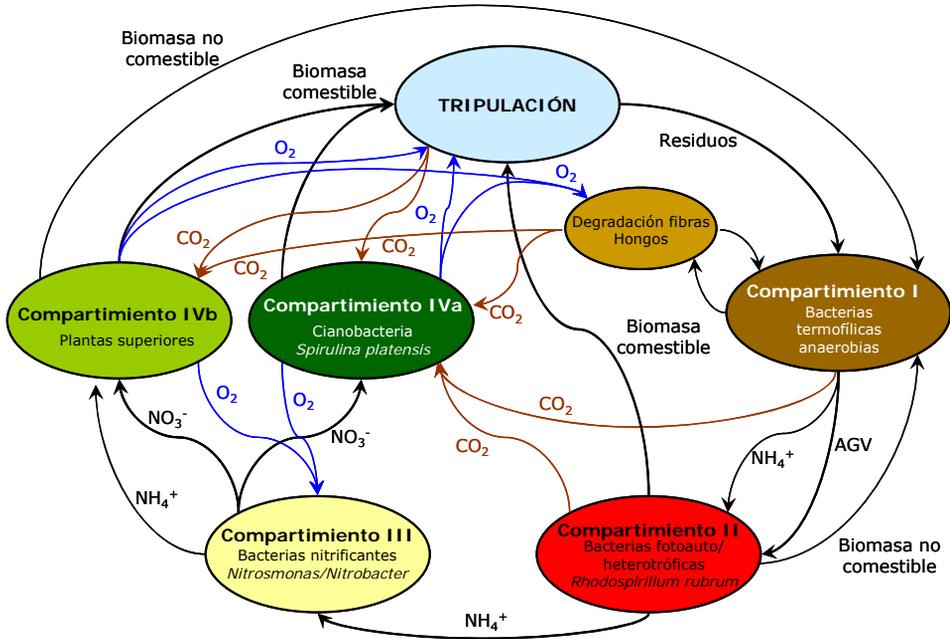


Figura 1.4: El bucle MELISSA (Cornet y Albiol, 2000)

El proyecto MELISSA no sólo permite el estudio de los sistemas de soporte de vida sino que también promueve el desarrollo de la tecnología necesaria para conseguir su objetivo. Es el caso del sistema de control, que en todo sistema de soporte de vida es muy importante y completamente necesario, y de sus sensores asociados, capaces de obtener información instantánea de las variables de proceso. La información obtenida de cada compartimento tiene que permitir la construcción de un modelo del sistema completo, que ha de revelar, incluso antes de que el ciclo real esté cerrado, el funcionamiento esperable y permitir la corrección de los problemas antes de que éstos surjan. Así, la modelización del sistema acelerará el proceso de su implantación al facilitar el estudio de diferentes escenarios simulados.

Como se ha dicho, este proyecto está dirigido y coordinado por la Agencia Europea del Espacio (ESA) desde su centro ESTEC (European Space Research and Technology Centre, Noordwijk, Holanda) y en su desarrollo intervienen diferentes entidades que desempeñan las siguientes funciones:

- EPAS (Ghent, Bélgica): desarrollan el compartimento I, incluyendo el sistema de preparación de la alimentación del bucle.
- Universidad de Ghent (Bélgica): desarrollan tecnologías complementarias a MELiSSA, en concreto para la fase degradativa.
- Universidad de Clermond Ferrand (Francia): desarrollan los modelos de comportamiento (cinéticos, estequiométricos, etc.) de cada uno de los compartimentos, así como del ciclo global, a partir de los diferentes datos experimentales obtenidos en el proyecto.
- VITO/SCK Mol (Bélgica): dedicados al estudio de los procesos de separación y de estabilidad genética de los microorganismos.
- SHERPA Engineering (Francia): desarrollan los sistemas de control basados en los modelos construidos dentro del proyecto.
- Universitat Autònoma de Barcelona (Catalunya, España): encargados de la operación de la planta piloto del proyecto, implementando los avances de todos los grupos de investigación. También desarrollan la integración de los diferentes compartimentos entre ellos y de la demostración a nivel terrestre de la viabilidad del concepto MELiSSA.
- Universidad de Guelph (Canadá): desarrollan el compartimento IVb, el compartimento de plantas superiores.

El estudio de los compartimentos se compone de varias etapas. En una fase inicial, de forma separada y a escala de laboratorio, se han obtenido datos de carácter básicos (determinación de las condiciones óptimas de crecimiento, la optimización de los medios de cultivo, la obtención de los primeros datos cinéticos, etc.), los cuales han servido para la elaboración de modelos matemáticos que describen el crecimiento de las diferentes cepas. Estos modelos han permitido desarrollar las leyes de control necesarias para mantener el funcionamiento de los diferentes reactores de forma estable y controlada. Una vez conseguido el correcto funcionamiento del reactor a escala laboratorio, se ha hecho el escalado a nivel de planta piloto y se ha demostrado su correcto funcionamiento, primero a nivel individual y después

integrando los diferentes compartimentos. El objetivo final de la planta piloto consiste en la demostración del bucle integrado, la cual dará paso a la etapa de adaptación del bucle al Espacio.

1.2.1. Descripción de los compartimentos

Como ya se ha comentado, el bucle MELISSA consiste en la interconexión de varios compartimentos, cada uno de los cuales tiene una función asignada: degradación anaerobia de los residuos (compartimento I), eliminación de ácidos grasos volátiles (compartimento II), nitrificación (compartimento III) y biosíntesis (compartimentos IVa y IVb).

Compartimento I: el compartimento digestor

El objetivo de este compartimento es la degradación biológica de los residuos sólidos y líquidos (hidrólisis de polímeros como celulosa, hemicelulosa, proteínas, etc.) que constituyen la salida del compartimento de la tripulación, así como la fracción no comestible de las plantas superiores del compartimento IVb y la biomasa producida en el conjunto del sistema no destinada al consumo humano.

A causa de que el consumo de oxígeno dentro del bucle es un parámetro que se intenta minimizar, se ha seleccionado el proceso de digestión anaerobia.

En la figura 1.5 se muestra un esquema general de un proceso de digestión anaerobia de materia orgánica. A diferencia de un metabolismo aerobio en el que los productos finales –agua y dióxido de carbono– se alcanzan en una sola etapa, la digestión anaerobia es una sucesión de etapas en el que los sustratos son secuencialmente degradados por distintos grupos de bacterias. No es posible alcanzar la completa degradación de la materia inicial utilizando una sola especie de microorganismo, por lo que se deben utilizar diferentes cepas de bacterias en un cultivo mixto. Existen tres grupos de bacterias responsables de la totalidad del proceso, que se compone de cuatro etapas claramente diferenciadas:

- *Bacterias fermentativas (o acidógenas)*: estas bacterias son las que llevan a cabo las dos primeras etapas: la hidrólisis y la acidogénesis. Los polímeros orgánicos son hidrolizados a monómeros solubles en agua, los cuales son de nuevo degradados mediante procesos de oxidación-reducción. Los productos

de la degradación son dióxido de carbono, hidrógeno gas y principalmente ácidos grasos volátiles como propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. Hasta cierto punto también existe la formación de formiato, lactato y alcoholes como butanol, etanol y metanol, dependiendo de las condiciones ambientales, así como de los substratos, pH y la presión parcial de H₂.

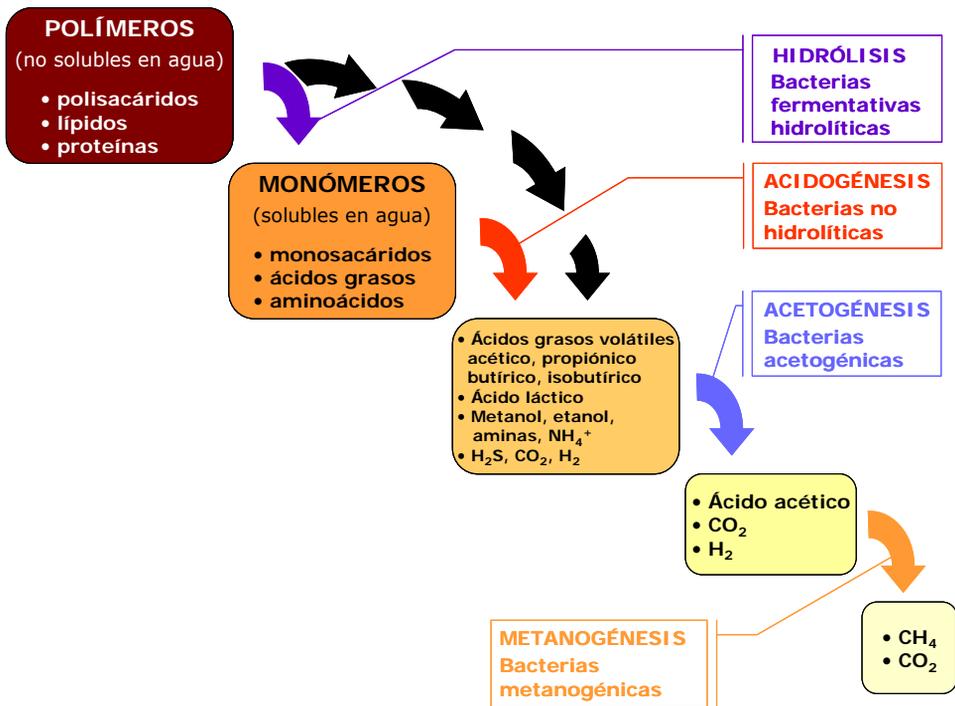


Figura 1.5: Esquema general del proceso de digestión anaerobia

- *Bacterias acetogénicas:* estos microorganismos rompen las cadenas de los productos formados en las dos etapas anteriores (ácidos grasos volátiles y alcoholes), dando lugar a acetato, hidrógeno gas y dióxido de carbono. Se ha demostrado que las reacciones no están termodinámicamente favorecidas a no ser que el hidrógeno gas formado sea eficientemente eliminado por las bacterias metanogénicas y las bacterias reductoras de sulfato y permanezca así, a concentraciones suficientemente bajas.

- *Bacterias metanogénicas*: estas bacterias producen metano, dióxido de carbono y agua a partir de acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Este tipo de bacterias se puede dividir en dos subgrupos principales: acetotróficas y bacterias hidrogenotróficas.

En los sistemas convencionales de digestión anaerobia se intenta maximizar la producción de metano. Contrariamente, en el bucle MELISSA es la producción de ácidos grasos volátiles el proceso que se desea estimular y se debe evitar la formación de metano, puesto que es un subproducto no deseado. Así, la etapa de metanogénesis debe ser inhibida (figura 1.6). En estudios preliminares se ha demostrado que la inhibición completa de la metanogénesis se produce cuando la concentración de amonio en el reactor es superior a 7 g/L (Demey y Van Meenen, 1998). La operación de los reactores a pH ligeramente ácidos (6.5) y en condiciones de termofilia (50 °C) permiten reducir la producción de metano y otros subproductos.

La selección de las cepas bacterianas que serán las encargadas de conseguir los niveles de degradación deseados es crítica en este compartimento, dada la complejidad de la transformación que se debe realizar. Dentro del proyecto MELISSA se han llevado a cabo numerosos experimentos en este sentido. En una primera aproximación se escogieron *Clostridium thermocellum* y *Clostridium thermosaccharolyticum* y más tarde se añadió a la selección preliminar *Coprotermobacter proeolyticus*. En diferentes experimentos realizados no se consiguió una degradación total del sustrato, tanto con una sola cepa como con cocultivos. Llegados a este punto, estos microorganismos fueron reemplazados por un inóculo consistente en una selección de cepas autóctonas obtenidas a partir de heces humanas. El análisis por PCR de estas cepas aisladas a partir del inóculo ha permitido determinar que las especies predominantes son *Ruminococcus bromii* y *Petroga mobilis* (Hermans y Demey, 1999).

Una de las limitaciones de este compartimento que impiden obtener un elevado porcentaje de degradación cuando se alimentan residuos humanos es la presencia de compuestos recalcitrantes como celulosa, xilanos y lignina. Para aumentar la eficacia de degradación de estos compuestos se realiza un pretratamiento enzimático. Aplicando estos procesos, se consigue una degradación de un 70% para las proteínas y una eficacia de degradación global del 50% (Hermans y Demey, 1999).

Los ácidos grasos volátiles y el amonio producidos durante la fermentación anaerobia son alimentados al segundo compartimento.

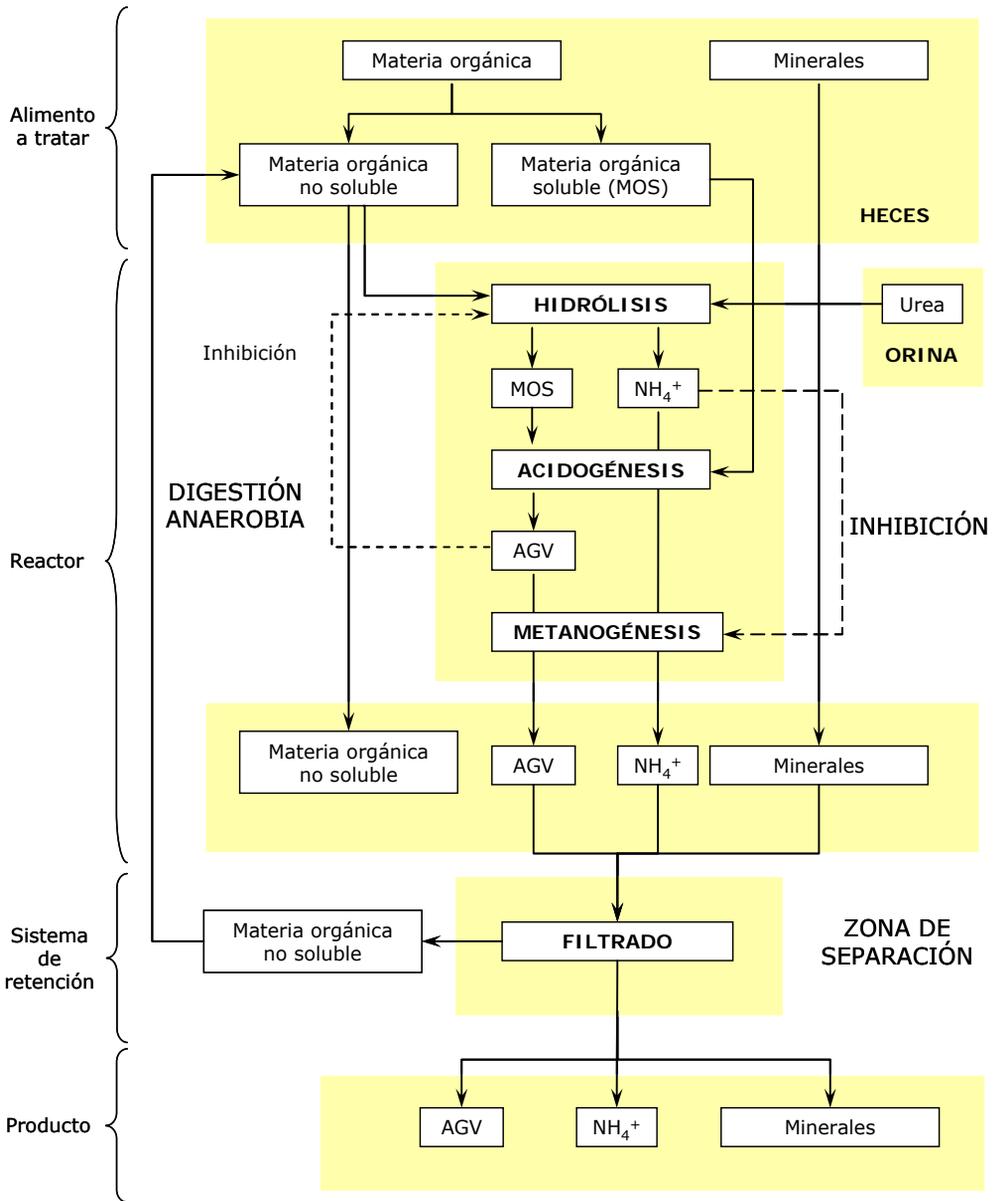


Figura 1.6: Digestión anaerobia desde el punto de vista del bucle MELISSA (AGV: ácidos grasos volátiles; MOS: materia orgánica soluble).

Este compartimento ya ha sido diseñado a nivel de escala piloto y en un futuro próximo se integrará a la resta de compartimentos de la planta piloto.

Compartimento II: el compartimento fotoauto/heterótrofo

El objetivo del segundo compartimento es metabolizar los productos resultantes de la degradación llevada a cabo en el primer compartimento. Los componentes principales esperados en el flujo procedente del primer compartimento son: ácidos grasos volátiles, algunos alcoholes, aminoácidos, aminas, muy poca cantidad de hidrógeno gas, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, etc. como se detalla más adelante en la tabla 1.5. Para transformar estos productos en biomasa en condiciones anaerobias, fue seleccionada una bacteria fototrófica (*Rhodospirillum rubrum*). Con la actividad de esta bacteria se espera que la salida principal sea una corriente rica en amonio. El consumo de ácido sulfhídrico se propuso que fuese llevado a cabo por otra cepa (por ejemplo, *Thiocapsa roseopersicina*).

Posteriormente, en el apartado 1.3 se profundizará en la descripción de este compartimento, puesto que el presente trabajo está centrado en su desarrollo.

Compartimento III: el compartimento nitrificante

Una vez se han llevado a cabo las transformaciones descritas en el segundo compartimento, los principales componentes que se esperan a su salida son: una fuente de amonio y nutrientes minerales, en la fase líquida, y dióxido de carbono en la fase gas. La fuente de nitrógeno se espera que sea mayoritariamente amonio, pero no puede ser descartada la presencia de otras fuentes de nitrógeno. Si se tiene en cuenta que la fuente de nitrógeno más conveniente para el crecimiento de las microalgas que colonizan el compartimento IVa es el nitrato, se hace necesaria la presencia en el bucle MELISSA de un compartimento que realice esta transformación.

Los microorganismos escogidos para llevar a cabo esta transformación son dos bacterias quimiolitotróficas: *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718) y *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25391), debido a que son las más estudiadas y, por tanto, de las que más información se dispone.

Estas bacterias pueden utilizar el dióxido de carbono como fuente de carbono mientras que obtienen la energía de la oxidación del amonio a nitrito (*Nitrosomonas sp.*) y de nitrito a nitrato (*Nitrobacter sp.*).

Uno de los retos en el desarrollo de este compartimento ha sido que se ha optado por trabajar con cultivos axénicos. Esto está motivado por el interés de que dentro del sistema de soporte de vida no haya microorganismos desconocidos. Así, se elimina el riesgo de que éstos pudiesen ser patógenos o bien de que pudiesen producir problemas desconocidos. Además, teniendo en cuenta que el funcionamiento global del sistema así como de cada uno de los compartimentos debe ser modelizado y posteriormente controlado, es preferible que los cultivos sean axénicos para que así todo el proceso sea lo más definido posible.

En la elección del tipo de reactor se optó por un sistema en el cual las células estuviesen inmovilizadas sobre un soporte, debido a que el crecimiento de estas bacterias es lento (velocidad específica máxima de 0.057 h^{-1} para *N. europaea*, Hunik *et al.*, 1994, y de 0.02 h^{-1} para *N. winogradskyi*, Hanaki *et al.*, 1990), su fase de latencia es larga y no son ni comestibles ni utilizables a ningún otro nivel del bucle MELISSA.

Los experimentos realizados para estudiar cómo inmovilizar las células se llevaron a cabo probando diferentes soportes de inmovilización y probando tres sistemas diferentes de operación: lecho fijo, lecho fluidizado y reactor de tanque agitado (Forler, 1992). De acuerdo con los resultados obtenidos, se decidió diseñar un biorreactor de lecho fijo, utilizando partículas de poliestireno (*Biostyr*) como soporte para la inmovilización. En la fase de diseño se tuvieron en cuenta problemas como la dificultad de esterilización (el soporte es sensible al calor), el volumen de biorreactor ocupado, la posibilidad de colmatación del lecho, la monitorización de la masa celular así como la automatización y control del funcionamiento. El diseño final se realizó en las instalaciones de ESTEC, dónde también se llevaron a cabo los primeros experimentos de caracterización física del reactor (Forler, 1994).

Actualmente esta columna se encuentra en funcionamiento en la planta piloto situada en la Universitat Autònoma de Barcelona (en adelante, UAB), donde se ha procedido a realizar la caracterización física del reactor, la implementación de la instrumentación del reactor, así como de todos sus lazos de control. Se han realizado también diferentes experimentos en cultivo continuo, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto (Pérez, 1997 y 2001), en los que se ha demostrado que este

sistema es capaz de convertir biológicamente el amonio en nitrato con un rendimiento muy elevado y con una producción de nitrito prácticamente despreciable.

Actualmente los trabajos en este compartimento están orientados a su modelización y sobre las leyes de control necesarias para que el biorreactor trabaje de forma robusta y fiable.

Compartimento IV: compartimento fotosintético

El cuarto compartimento tiene encomendada como función principal la producción de alimento para la tripulación, así como es también el responsable de la regeneración de la atmósfera y de la recuperación del agua.

Inicialmente, el cuarto compartimento estaba únicamente basado en el crecimiento de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, pero a medida que se fue profundizando en el estudio del concepto MELISSA, diversos factores evidenciaron la necesidad de incluir un módulo de plantas superiores. Entre estos factores está el hecho de que la presencia de productos vegetales en la dieta humana no sólo es conveniente, sino necesaria. También es cierto que la inclusión de plantas superiores permitirá alcanzar un grado de cierre más elevado en el conjunto global del bucle, logrando así un sistema más completo con un mayor grado de aproximación a la solución que finalmente habrá que adoptar, en la que seguro que figurarán módulos de plantas superiores.

El compartimento IVa: el compartimento fotoautótrofo

Este compartimento es el que más se ha estudiado y por tanto del que más datos se dispone. Está colonizado por la cianobacteria *Arthrospira platensis*, que es el microorganismo autótrofo que mejor se ajustó a los requerimientos que exige este compartimento, que son los siguientes:

- Buen rendimiento energético de la fotosíntesis.
- Valor nutricional elevado.
- Tiempo de generación notablemente corto.
- Baja sensibilidad a los microorganismos patógenos y en general un bajo riesgo de contaminación debido a que su pH óptimo de crecimiento es bastante elevado (entre 8 y 10).
- Buena digestibilidad. No tóxica.

Se han realizado estudios de la influencia de la intensidad de la luz en el crecimiento de la cianobacteria. El crecimiento exponencial pasa a ser lineal cuando la intensidad de luz empieza a ser un factor limitante del crecimiento, debido al aumento del apantallamiento. También se ha apreciado que cuando se irradia el cultivo con exceso de luz, aumenta el porcentaje de polisacárido extracelular producido (EPS). Esta influencia de la intensidad de la luz suministrada al cultivo sobre la composición de la biomasa abre la puerta a la posibilidad de utilizar estos factores limitantes del crecimiento para ajustar las proporciones de los distintos componentes de la biomasa a las mejores relaciones para la dieta humana.

Teniendo en cuenta la importancia de la influencia de la luz en la composición celular de la *Arthrospira platensis*, se ha desarrollado un modelo matemático, basado en las ecuaciones de transmisión de la radiación de Shuster (Shuster, 1905), que permite predecir la distribución de la luz en el interior del reactor, en función de la concentración de células y de la intensidad de luz incidente (Cornet *et al.*, 1992).

Los trabajos realizados hasta el presente momento en la planta piloto del proyecto se han llevado a cabo en fotobiorreactores de tipo «air-lift» de 7 y 77 litros de capacidad cada uno. Éste último es un «air-lift» con *loop* externo, diseñado y escalado a partir de la experiencia previa con el de 7 litros de volumen. En los ensayos realizados se ha estudiado la operación en continuo a diferentes intensidades de iluminación, velocidades de dilución y concentraciones de nutrientes entre otros parámetros (Vernerey, 2000). El fotobiorreactor funciona con un sistema de control desarrollado a partir del modelo matemático.

El compartimento IVb: el compartimento de plantas superiores

Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de productos vegetales en la dieta humana es necesaria. De hecho, una dieta basada únicamente en *Arthrospira platensis* y en *Rhodospirillum rubrum* sería insuficiente desde el punto de vista nutricional, básicamente por dos motivos:

1. El contenido de ácidos nucleicos presente en la composición de los microorganismos limita el consumo diario máximo humano permitido.
2. Una dieta equilibrada contempla la inclusión de dos fuentes de alimentos diferentes como mínimo. Una nutrición humana satisfactoria requiere la ingesta de sustancias orgánicas en forma de fruta, vegetales y carne, siendo nutrientes

principales los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, así como las vitaminas y los minerales.

Para definir una dieta equilibrada para un astronauta es necesario tener en cuenta dos factores: los requerimientos metabólicos y la relación requerida entre los nutrientes principales. Por un lado, los requerimientos metabólicos considerando la actividad del ser humano en el Espacio equivaldrían a una energía media necesaria (EER) de 3000 kcal/día. Por otro lado, para tener una aproximación de la relación requerida entre los nutrientes principales en la dieta humana, se puede hacer una media de los valores diarios obtenidos por Soyuz en el *Skylab*. En la tabla 1.3 se puede observar un ejemplo de dieta equilibrada para un astronauta.

	Porcentaje másico	Porcentaje (EER)
Proteínas	21.25	17.50
Lípidos	14.97	28.37
Carbohidratos	63.79	53.73
TOTAL	632 g/(persona·día)	3000 kcal/(persona·día)

Tabla 1.3: Ejemplo de dieta equilibrada para un astronauta. EER: energía media necesaria.

Tomando como base esta dieta, con una alimentación basada únicamente en *Arthrospira platensis* con aportaciones de *Rhodospirillum rubrum* se podría satisfacer la demanda diaria de proteínas, pero no ocurriría lo mismo con las necesidades de carbohidratos y lípidos.

Además de suponer un complemento nutritivo esencial, la inclusión de las plantas superiores en un sistema de soporte de vida también aporta ventajas muy importantes como la regeneración de la atmósfera o la recuperación del agua mediante el proceso de transpiración. Por otra parte, ayudan a crear un entorno más similar al de la Tierra, lo cual se traduce en un confort psicológico para la tripulación.

La selección de plantas que pueden ser utilizadas en un sistema ecológico cerrado de soporte de vida tiene que tener en cuenta los siguientes criterios:

- Producción de biomasa y aspectos nutricionales
- Requerimientos de las plantas y condiciones de crecimiento
- Capacidad de regeneración de la atmósfera

Capítulo 1 - Introducción

- Capacidad de regeneración de los residuos
- Capacidad de regeneración del agua
- Comportamiento en ambiente de microgravedad
- Interacciones con los otros sistemas

Asimismo, las plantas pueden ser clasificadas en dos grupos diferentes atendiendo a si su valía está motivada por razones nutricionales, o bien, porque tengan un valor psicológico elevado. En la tabla 1.4 se hace una breve relación de especies, clasificadas en función de este criterio (Poughon, 1997).

Elevado valor nutricional	Elevado valor psicológico
Trigo	Judía halada
Arroz	Brécol
Patata	Fresa
Boniato	Cebolla
Judía de soja	Guisante
Cacahuete	Tomate
Lechuga	
Remolacha	
Espinaca	

Tabla 1.4: *Especies de plantas superiores, clasificadas en función de si el interés es por su valor nutricional o bien por su valor psicológico (Poughon, 1997).*

En el marco del proyecto MELISSA se están realizando estudios con el objetivo de diseñar una dieta lo más equilibrada posible, para un grupo de 6 astronautas, con un menú cíclico de 10 días. Se ha optado por plantear un cultivo de 25 especies diferentes (brécol, remolacha, judía, zanahoria, hierbas, col, pepino, lechuga, cebolla, cebolla tierna, pimiento, cacahuete, patata, arroz, boniato, soja, espinaca, tomate, trigo, alfalfa, pimientos picantes, champiñones, guisantes y calabaza).

En una primera aproximación, de todas las opciones posibles, se ha optado por la presencia en el compartimento de plantas superiores del bucle MELISSA por ocho especies diferentes, pertenecientes a los dos grupos de alimentos: el trigo, el arroz, la

patata, la judía de soja y la lechuga, por su valor nutricional, y la cebolla y el tomate por su valor psicológico.

Estos estudios han permitido determinar que el área de cultivo necesaria para poder suministrar un menú cíclico para una tripulación compuesta por 6 miembros es de 453 m², asumiendo que la producción es continua. También se ha hecho una estimación de la cantidad total de masa requerida, que sería de 439 kg por ciclo de menú o 7.3 ESM/(persona·día) (Cloutier *et al.*, 2000).

Compartimento V: la tripulación

Los compartimentos I, II, III y IV del bucle MELiSSA han estado concebidos y diseñados para satisfacer las necesidades de este otro compartimento, es decir, proporcionarle oxígeno, agua y nutrientes en la medida que requiera, a partir de los residuos que origina.

Estas necesidades son las del metabolismo cotidiano de una persona (figura 1.7), multiplicadas por el número de personas que forman la tripulación.

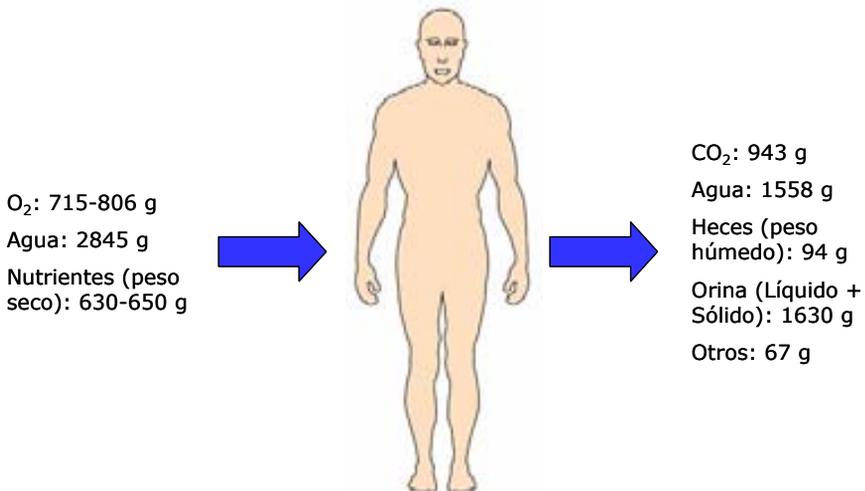


Figura 1.7: Principales componentes del metabolismo cotidiano simplificado de una persona

No obstante, en el estudio de este compartimento a nivel de laboratorio y de planta piloto se ha escogido la rata como organismo modelo, simplificando de esta manera, todos los aspectos tanto regulativos como de coste relativos a la participación de personas en los experimentos para completar el bucle MELiSSA. Se considera pues, que en una primera fase se podrán abordar las preguntas asociadas a este trabajo mediante la utilización de animales como modelo. La incorporación de personas en la experimentación se prevé efectuar en etapas posteriores del desarrollo de MELiSSA, y requerirá desarrollar todos aquellos aspectos asociados (control de dieta, seguimiento del estado de salud, diseño de un habitáculo, etc.).

La elección de la rata como modelo está justificada si se tiene en cuenta que se trata de un animal mamífero que puede ser utilizado fácilmente en experimentos del laboratorio, que fisiológicamente está muy bien estudiado y que comparte características dietéticas comunes con el ser humano.

Inicialmente fueron realizados diversos estudios usando ratas de laboratorio con la intención de conocer la aceptación de la incorporación de *Arthrospira platensis* en la dieta de estos animales. En los primeros experimentos, la dieta alimentada a las ratas consistía en un 50% de *Arthrospira platensis* y se mantuvo en períodos de 15 días. Los resultados fueron muy positivos, puesto que no se observaron diferencias significativas (ANOVA) en cuanto a la ganancia de peso, el consumo de comida y salud de los animales entre los grupos experimentales y el de control.

En una segunda serie de experimentos, de 17 semanas de duración, se siguió un grupo más extenso de parámetros. Durante este periodo, se compararon ratas con una dieta normal con ratas alimentadas utilizando tanto una dieta deficiente como una dieta deficiente con inclusión de diferentes porcentajes de *Arthrospira platensis* (5-40%). No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos. La dieta deficiente indujo a un grado de disfunción que se observó en un aumento del peso del hígado, en el nivel de colesterol, de triglicéridos y de la GOT (glutámico oxalacético transaminasa). La inclusión de *Arthrospira platensis* en la dieta pareció corregir los niveles de colesterol, pero no fue tan claro en el caso de los triglicéridos y de GOT. Cuando la fracción de *Arthrospira platensis* en la dieta era del 40%, se detectó un descenso significativo en el nivel de glucosa en sangre así como una disminución en la producción de dióxido de carbono (aunque estadísticamente no fue significativa). Estos resultados fueron interpretados como la consecuencia de un posible efecto tóxico que alteraba las funciones hepáticas. La conclusión fue que la *Arthrospira*

platensis puede compensar algunos parámetros en dietas deficientes pero que también podría tener efectos tóxicos a elevadas dosis durante períodos prolongados de tiempo.

Estudios posteriores aumentaron el porcentaje de *Arthrospira platensis* en la dieta de la rata sin observar problemas de toxicidad (Tranquille *et al.*, 1994). Se deberá continuar estudiando los efectos de la ingesta de esta cianobacteria a altas dosis durante períodos prolongados de tiempo para clarificar algunos detalles y disponer de resultados contrastados.

El segundo aspecto que hay que considerar a nivel experimental en este compartimento es la generación de residuos. El planteamiento actual del proyecto MELISSA prevé la utilización de residuos humanos, aunque aún no han sido diseñados ni el sistema de recogida ni los protocolos experimentales que se utilizarán. Para su diseño se deberán considerar aspectos tales como el control de la dieta de los voluntarios que aporten el material residual (heces y orina).

Interacción entre los compartimentos de MELISSA

El estudio de la interconexión de los diferentes compartimentos que componen el bucle MELISSA es un punto especialmente importante, puesto que para que el bucle opere a un nivel elevado de cierre es fundamental el hecho de que los compartimentos no interaccionen de forma negativa entre ellos. Es decir, que los resultados de las transformaciones realizadas en un biorreactor no sean tóxicos o nocivos para los organismos de los siguientes compartimentos.

Se han llevado a cabo varias experiencias en este campo con la finalidad de comprobar si existe algún efecto de toxicidad para algún organismo del bucle MELISSA debido a la conexión de los diferentes compartimentos.

Los primeros experimentos consistieron en evaluar el funcionamiento de los compartimentos II, III y IVa a nivel de laboratorio utilizando un medio sintético compuesto por ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico como fuente de carbono para el compartimento II. En esta serie de experimentos no se observó efectos nocivos o tóxicos en ninguno de los biorreactores (Creus, 2003).

Otro de los experimentos llevados a cabo trató sobre la conexión de los compartimentos III y IVa, a nivel de escala piloto, durante un período largo de tiempo. Durante este experimento no apareció ninguna complicación mayor.

Por último, se ha llevado a cabo satisfactoriamente la conexión de la fase líquida de los compartimentos I, II, III y IVa durante más de cinco tiempos de residencia (Creus, 2003). En este tiempo no apareció ninguna dificultad importante ni ningún efecto tóxico o nocivo en ningún compartimento.

En un sistema ecológico cerrado como es el caso del bucle MELiSSA, también es trascendente evaluar cuáles son los efectos sobre un compartimento cuando el proceso previo está atravesando un período crítico y su efluente no es el esperado.

En esta materia también se han llevado a cabo experimentos con la finalidad de observar complicaciones de operación cuando algún biorreactor abandona el estado estacionario para entrar en estados transitorios.

Se ha estudiado con detalle el efecto que produce una conversión parcial de amonio a nitrato en el compartimento III, observándose que la *Arthrospira platensis* tolera correctamente concentraciones de hasta 50 ppm de nitrito y, aunque es capaz de usar el nitrito como fuente de nitrógeno, no lo hace cuando tiene otras fuentes disponibles como el amonio o el nitrato.

Otro experimento llevado a cabo en esta materia ha radicado en el estudio del comportamiento del compartimento III cuando éste recibe un afluente rico en ácidos grasos volátiles (ácido acético), debido por ejemplo a un aumento en la carga que hay que tratar por el compartimento II o bien por alguna disfunción de este compartimento.

Los resultados observados determinaron que los ácidos grasos volátiles no representan una amenaza de toxicidad para el cocultivo de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

1.2.2. El sistema de control del bucle MELiSSA

Para obtener un funcionamiento óptimo de un sistema ecológico de soporte de vida, es necesario disponer de un sistema de control capaz de mantener la estabilidad del bucle, optimizar la productividad para conseguir el máximo cierre posible y lo más

importante, asegurar la supervivencia de la tripulación. Éstos, también son los objetivos del sistema de control del bucle MELISSA.

Para la consecución de estos objetivos, el sistema de control debe ser capaz de optimizar en línea una serie de variables o parámetros. También es necesario que el sistema disponga de los datos relevantes, tanto actuales como históricos. El desarrollo de este sistema requiere la progresiva incorporación del conocimiento del comportamiento de cada uno de los compartimentos a modelos matemáticos, que deben ser evaluados por el sistema de control para decidir las acciones de control.

La estrategia de control implementada en el bucle MELISSA consiste en considerar que el sistema global está dividido en subsistemas interconectados. Cada subsistema representa una entidad física diferente, es decir, cada uno de los compartimentos. La estabilidad global del bucle MELISSA depende pues, de la estabilidad individual de los compartimentos.

El sistema de control del bucle MELISSA está estructurado en cuatro niveles jerárquicos, cada uno con una función específica y con el siguiente esquema de funcionamiento:

- *Nivel 0, Local:* Este nivel está compuesto por el proceso y por su correspondiente nivel de regulación más próximo. Los biorreactores están equipados con sensores los cuales proporcionan datos que son usados para modificar, siguiendo una estrategia fija, los valores de las diferentes variables de proceso. Dentro del bucle MELISSA este nivel de control se identifica con las regulaciones de una sola variable, como es el caso de la temperatura, el pH, la intensidad de luz incidente, etc.
- *Nivel 1, Regulación del proceso:* Este nivel incluye la regulación de los valores de las variables de salida importantes del proceso, los cuales son obtenidos mediante la instrumentación requerida y definen la correcta operación de la planta. En este nivel de control estarían englobadas las regulaciones multivariables, las respuestas de las cuales son generalmente superiores a las del nivel 0, como por ejemplo, el control de la concentración de biomasa en un biorreactor.

- *Nivel 2, Optimización:* Este nivel de control es el responsable de fijar los puntos de consigna (*set-points*) de las variables que componen el nivel 1 a partir de los requerimientos de cantidad y calidad solicitados al sistema. El objetivo de este nivel es establecer la operación de la planta de manera que las especificaciones de cantidad y calidad se cumplan minimizando los costes de producción.

Dentro del bucle MELISSA y a nivel de planta piloto la optimización de calidad se basa en controlar la posible contaminación entre compartimentos o la calidad del flujo de la interconexión. Sin embargo, cuando se piensa en la aplicación del sistema MELISSA en el Espacio, los costes básicos dependen sobre todo del peso y del volumen del sistema. Así pues, la optimización requiere minimizar estos factores, reduciendo por ejemplo, los tanques pulmón intermedios o los diferentes tiempos de residencia.

- *Nivel 3, Planificación de la producción:* En general, se entiende que este nivel de regulación incluye la planificación de la producción de la planta en función de los requerimientos, necesidades y reservas existentes. Esta actividad de regulación se sostiene utilizando las estrategias de mando óptimas considerando los aspectos dinámicos del proceso. El buen funcionamiento de este nivel de regulación está directamente relacionado con la consecución de los objetivos de los niveles inferiores de regulación planteados.

Dentro del esquema de funcionamiento del bucle MELISSA, este nivel de regulación se identificaría con la planificación de la productividad de los diferentes compartimentos en función de los menús y nivel de actividad de la tripulación.

La configuración actual del sistema de control consiste en una red Ethernet de 100 Mbps, con varias estaciones conectadas. En la figura 1.8 se presenta un esquema general del sistema de control de la planta piloto. Se pueden distinguir tres tipos diferentes de estaciones: el servidor con función de base de datos históricos, el cliente de supervisión/gestión y el controlador *master*. Éste último utiliza *Microsoft Windows 2000 Server* como sistema operativo y las leyes de control están integradas en una aplicación *iFix SCADA*. El cliente de supervisión/gestión dispone de un sistema operativo *Microsoft Windows XP Professional* y la aplicación "iFix SCADA Development Client" el cual comanda directamente dos PLCs *Quantum* a través de la aplicación *Schneider Concept 2.5*. La máquina que funciona como base de datos históricos

utiliza como sistema operativo *Microsoft Windows 2000 Server* y utiliza la aplicación *Microsoft SQL Server 2000*.

El sistema de control completo ya está implementado para el compartimento IV (fotoautótrofo) y se está empezando a desarrollar para el compartimento II (fotoauto/heterótrofo) y para el compartimento III (nitrificante).

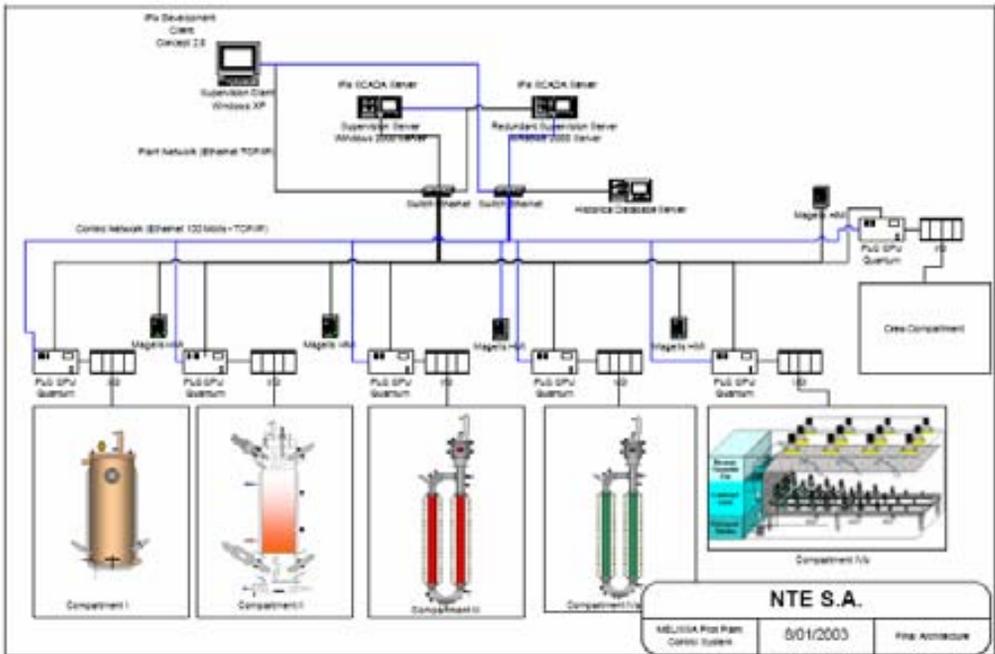


Figura 1.8: Esquema general del sistema de control implementado en la *planta piloto*.

1.2.3. La planta piloto

La planta piloto del proyecto es el centro de gravedad del proyecto puesto que su función es esencial. En esta instalación es donde se implementan todos los avances realizados en el proyecto por los diferentes colaboradores. También, todos los datos obtenidos son puestos a disposición de todos los grupos implicados para que la información sea procesada. De esta manera se consigue la respuesta necesaria que permite el continuo progreso del proyecto (Lasseur y Fedele, 2000).

La función esencial de la Planta Piloto consiste en primer lugar en diseñar, construir, instalar y operar cada uno de los compartimentos a escala piloto, para demostrar y caracterizar su operación. En segundo lugar, los distintos compartimentos deben ser integrados entre sí, con el fin de completar el bucle de biorreactores y demostrar la viabilidad de MELISSA y su operación de forma continuada y controlada. A partir de estos datos se podrán diseñar nuevas etapas. El escenario considerado para esta etapa de integración y demostración por el consorcio MELISSA, y para el que se han diseñado los equipos a nivel piloto, es la generación de una cantidad de O₂ equivalente a la respiración de una persona y la generación de material comestible equivalente al 25% del consumo de una persona.

La Planta Piloto del proyecto MELISSA estaba situada en las instalaciones de ESTEC (Noordwijk, Holanda) y en abril de 1995 fue trasladada al *Departament d'Enginyeria Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, donde se encuentra actualmente. El estado actual de desarrollo de los distintos compartimentos es el siguiente:

- ▶ El compartimento I ha sido diseñado y construido en Bélgica, ya a escala piloto (100 L), y ha llegado a la Planta Piloto el pasado mes de marzo.
- ▶ El compartimento II, cuyo diseño forma parte de este trabajo, se encuentra en fase de construcción y su capacidad a nivel piloto será de 25 L.
- ▶ Los compartimentos III y IVa se encuentran operando en la Planta Piloto a escala piloto (8 L y 77 L, respectivamente) de forma satisfactoria.
- ▶ El compartimento IVb se está construyendo en Canadá y se implementará en la Planta Piloto en el próximo mes de septiembre.
- ▶ El compartimento V se encuentra en fase de diseño.

Las prestaciones que ofrece el laboratorio en el que está instalada la Planta Piloto del bucle MELISSA son las que se detallan a continuación:

- Sistema de presión positiva (recirculación de aire estéril).
- Grupo electrógeno (que se pone en funcionamiento de forma automática ante un corte de fluido eléctrico).
- Servicio de alimentación ininterrumpida de electricidad (SAI).
- Aire acondicionado.
- Circuito de refrigeración.
- Línea de vapor a 6 kg/cm² de presión, para la esterilización *in situ* de los reactores.

- Líneas de gas técnico (N_2 , O_2 , CO_2 , He y aire).
- Línea de agua destilada.

Una visión general de la Planta Piloto se presenta figura 1.9. Recientemente, la Planta Piloto se ha trasladado a un laboratorio nuevo y más amplio, y en la actualidad se están montando todos los reactores y equipos auxiliares.



Figura 1.9: Visión general de la Planta Piloto del proyecto MELISSA. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Autònoma de Barcelona.



Figura 1.10: Instalaciones de la nueva Planta Piloto del proyecto MELISSA. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Autònoma de Barcelona.

1.3. El compartimento II

Como se ha señalado anteriormente, el compartimento II ha sido concebido dentro del bucle MELISSA con el objetivo de que degrade todos los ácidos grasos volátiles producidos en el compartimento I (tabla 1.5), mediante la utilización de bacterias fotosintéticas que, a la vez, sean susceptibles de servir como alimento.

Para conseguir este objetivo se ha concebido utilizar dos bacterias diferentes, ambas fotosintéticas. Una sería la encargada de consumir la fuente de carbono y la otra sería la responsable de consumir el posible hidrógeno gas y el dióxido de carbono. En una primera selección se escogieron *Rhodospirillum rubrum* (en adelante, *R. rubrum*) y *Rhodobacter capsulata* (en adelante, *R. capsulata*) como las bacterias más apropiadas para colonizar este compartimento.

Fuentes de carbono	Fuentes de nitrógeno	Otros
Ácido acético	Amonio	Hidrógeno
Ácido propiónico	Urea	Nutrientes minerales
Ácido butírico	Aminoácidos	Vitaminas
Ácido isobutírico	Aminas	Ácido sulfhídrico
Ácido valérico		
Ácido isovalérico		
Ácido caproico		
Ácido isocaproico		
Dióxido de carbono		

Tabla 1.5: Composición esperada a la salida del Compartimento I

De forma preliminar se ha estudiado el crecimiento bajo diferentes sustratos: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico y etanol como fuentes de carbono, y amonio, urea, betaína y glutamato como fuentes de nitrógeno (Albiol, 1994). En estos experimentos se apreció que ninguna de las dos cepas podía crecer utilizando etanol como única fuente de carbono (aunque es conocido que el *R. rubrum* es capaz de sintetizar etanol deshidrogenada), tal vez por la no disponibilidad de dióxido de carbono. También sirvieron estos experimentos para poner de manifiesto que el

amonio era la mejor fuente de nitrógeno, puesto que era la primera que consumían, y que el glutamato era la menos utilizada. No obstante, este no debería ser el caso una vez los ácidos grasos volátiles se hayan agotado, pero no existen pruebas experimentales. Este hecho hace que aún sea más importante la necesidad de que el consumo de los ácidos orgánicos sea total en el compartimento fotoheterotrófico.

Las dos cepas utilizadas en estos experimentos pudieron crecer en condiciones autotróficas ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$), aunque *R. capsulata* mostró una velocidad de crecimiento superior. También se comprobó un hecho, conocido de antemano, que para conseguir que las cepas crezcan de forma autotrófica, se requiere la ausencia completa de sustancias orgánicas en el medio de cultivo. Por este motivo, se propuso dividir el compartimento II en dos subcompartimentos (figura 1.11), de manera que uno fuese el encargado de la degradación de las fuentes orgánicas de carbono y el otro del consumo del hidrógeno gas formado en el primer compartimento.

El primer subcompartimento, el IIa, estaría colonizado por *R. rubrum* y operaría en condiciones fotoheterotróficas. En él, los ácidos grasos de la entrada representarían la fuente de carbono y la fuente de electrones. En el segundo subcompartimento, el subcompartimento fotoautotrófico, crecería *R. capsulata* y el hidrógeno sería utilizado como fuente de electrones para la fijación del dióxido de carbono, que sería la fuente de carbono. En función de la eficacia obtenida en el consumo del carbono orgánico, existen diferentes configuraciones posibles para el flujo de líquidos entre los dos subcompartimentos.

Se han llevado a cabo experimentos preliminares en cultivo continuo con *R. capsulata* (Gicqueau, 1993), pudiendo determinar la composición elemental de la biomasa así como el efecto de la intensidad de luz incidente en su composición.

Otros experimentos en cultivo continuo, esta vez con *R. rubrum* (Viprey, 1994), bajo limitación de nitrógeno permitieron determinar la composición elemental de la biomasa en estas condiciones y el efecto de esta limitación en su composición.

Estos microorganismos fotoautótrofos han sido considerados como fuente de proteína unicelular (Kobayashi y Haque, 1971; Litchfield, 1983) y la calidad de la composición de la biomasa ha sido descrita (Sawada y Rogers, 1977; Shipman *et al.*, 1975; Vrati y Verma, 1983, Vrati, 1984). Por ejemplo, el contenido en metionina es comparable con el de referencia de la FAO (*Food and Agricultural Organization*) y es superior al de la carne y de la soja. Se han utilizado en piscicultura, horticultura y en la industria

avícola. Nunca se ha registrado ningún comportamiento tóxico o patógeno. Así pues, se considera que estos microorganismos son comestibles, aunque no existe ningún estudio efectuado en humanos.

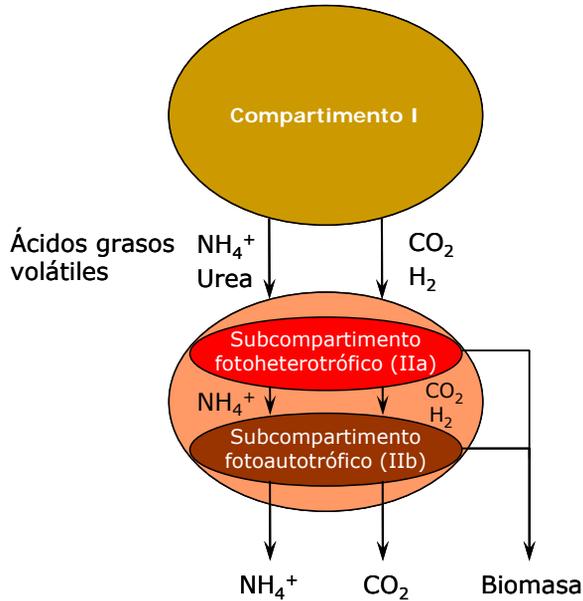


Figura 1.11: Esquema de los dos subcompartimentos que componen el compartimento II (Albiol, 1994).

También se han utilizado estos microorganismos en otras aplicaciones comerciales, como es el caso del sector de los pigmentos, dado que sus carotenoides son un excelente colorante natural.

Se ha demostrado que *R. capsulata* puede consumir el sulfuro de hidrógeno, pero esto lleva a la acumulación extracelular de azufre elemental (Hansen *et al.*, 1972; Kompatseva, 1981). Como se espera un comportamiento similar para *R. rubrum*, será necesario utilizar una cepa para que realice la transformación de oxidar el sulfuro a sulfato. En una primera selección se consideraron los géneros *Thiobacillii* y *Thiocapsa*. Pero estas cepas son aerobias estrictas y sólo se podrían utilizar en el tercer compartimento.

No obstante, se propuso el uso de un microorganismo del segundo género citado para ser utilizada bajo condiciones anaerobias en el compartimento II. Así, se realizaron experimentos preliminares con diferentes cepas de *Thiocapsa roseopersicina*. Los resultados obtenidos mostraron el crecimiento de estas bacterias utilizando el sulfuro de hidrógeno como fuente de electrones, hasta una concentración de 0.5% de la concentración a la que ya no hay crecimiento (la oxidación se da inicialmente a sulfito con acumulación intracelular y la consiguiente oxidación hasta sulfato). Las fuentes de carbono utilizadas fueron acetato, lactato y etanol, mientras que las fuentes de nitrógeno fueron amonio y urea. Sin embargo, en los primeros experimentos para comprobar el crecimiento en efluentes de un cultivo de *Clostridia* tuvieron un resultado negativo.

En los últimos años, los trabajos en el compartimento II del bucle MELiSSA se han centrado en el subcompartimento fotoheterotrófico. Es necesario optimizar el funcionamiento de este subcompartimento para que el consumo de los compuestos orgánicos presentes en el afluente sea completo y así evitar la inhibición del crecimiento fotoautotrófico en el segundo subcompartimento.

Más adelante, cuando se avance en el estudio del compartimento I, se conocerá de forma definitiva la composición del efluente de este compartimento y se evidenciará la existencia o no de hidrógeno molecular y sulfuro de hidrógeno. Así pues, el futuro estudio del subcompartimento fotoautotrófico dependerá de los resultados que se obtengan en el desarrollo del compartimento I.

El trabajo que se presenta se ha concentrado pues, en la caracterización del módulo fotoheterotrófico, utilizando *R. rubrum*.

1.4. *Rhodospirillum rubrum*

Las bacterias fototróficas no anoxigénicas son un grupo de organismos fotosintéticos ampliamente extendido y metabólicamente muy diverso, el cual habita en ambientes anaerobios expuestos a la luz. Desarrollan un papel importante en los ciclos de materia anaerobios, tanto los fotoautótrofos, como productores primarios, como los fotoheterotróficos como consumidores de compuestos orgánicos reducidos gracias al aporte de luz.

El primer trabajo de aislamiento y de cultivo puro de una bacteria púrpura no del azufre fotosintética se atribuye a Edwin Esmarch, ayudante de Robert Kock alrededor de 1887, al que denominó *Spirillum rubrum* (actualmente *Rhodospirillum rubrum*) por su llamativo color rojo.

Pfenning y Trüper (1971) han propuesto que los organismos fototróficos anoxigénicos sean divididos en cuatro subgrupos, de acuerdo con sus características fisiológicas y ecológicas. Esta clasificación encaja perfectamente con las características metabólicas de cultivos puros representativos de cada uno de los varios grupos. Los dos grupos más importantes, las bacterias púrpuras y las bacterias verdes, están compuestos por tres familias, con diferentes géneros dentro de cada una de ellas. Los miembros de las familias *Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae* y *Chlorobiaceae* utilizan compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones para la fijación del dióxido de carbono autotróficamente; todos los miembros de esta familia crecen bien en medios completamente inorgánicos que contienen relativamente altos niveles de sulfuro. Por otro lado, las otras dos familias, *Rhodospirillaceae* y *Chloroflexaceae* (conocidos como bacterias púrpuras y verdes no del azufre, respectivamente), contienen especies que crecen mejor de forma fotoheterotrófica, aunque los más representativos son también capaces de crecer de forma fotoautotrófica con hidrógeno y ácido sulfhídrico como fuentes de electrones.

El *Rhodospirillum rubrum* es una bacteria Gram negativa que se multiplica por división binaria (Imhoff y Trüper, 1989) y no acumula azufre dentro de su citoplasma. Se puede encontrar en entornos naturales donde haya sedimentos, en regiones anaerobias y a las que llegue la luz en cantidad suficiente para su crecimiento. Lugares donde se ha detectado frecuentemente su presencia son los lodos de lagos, aguas estancadas y en general, entornos acuáticos donde haya suelos húmedos.

Capítulo 1 - Introducción

Las células de *R. rubrum* son espirales la mayoría de las veces, en ocasiones solamente arqueadas. Según el medio de cultivo utilizado y las condiciones de crecimiento pueden presentar una gran variación morfológica. El tamaño de las células varía fuertemente dentro del mismo cultivo. La anchura de la célula está comprendida entre 0.8 y 1 μm . Sin embargo, la anchura de la espiral varía entre 1.5 y 2.5 μm y de 7 a 10 μm su longitud.

Al revés de las bacterias verdes, la mayoría de las bacterias púrpuras (del azufre y las no del azufre) a menudo son flageladas y se desplazan rápidamente a gran velocidad dentro del medio (Neidhardt *et al.*, 1994). Las células jóvenes son muy móviles gracias a un flagelo polar (flagelo en el extremo de la célula). Los flagelos sólo se desarrollan si la bacteria crece en un medio líquido o, en extremo, en un medio semilíquido (agar-agar).

Las células cultivadas en anaerobiosis en medio líquido son de color rojo o rojo oscuro. En cambio, cuando crecen de forma aerobia o sin iluminación, son de color gris pálido con un ligero tono rosado. Cuando crecen en placa en medio semilíquido, las colonias que se forman son de color rojo oscuro y de forma lenticular de 1-2 mm de diámetro.

La cepa se cultiva fácilmente en medio líquido y crece en un margen de pH entre 6 y 8.5, estando los valores óptimos comprendidos entre 6.8 y 7.2. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 35 °C.

El *R. rubrum*, como el resto de *Rhodospirillaceae*, presenta una gran diversidad metabólica, siendo capaz de crecer de cinco modos diferentes: fotolitoautotróficamente, fotoheterotróficamente, heterotróficamente, quimiolitotróficamente y quimioheterotróficamente. En la tabla 1.6 se describen estos tipos de metabolismo.

El modo de cultivo preferente es en condiciones de fotoheterotrofia anoxigénica, con diferentes compuestos como fuente de carbono y fuente de electrones (Imhoff, 1995). Los principales substratos asimilables en condiciones fotoheterotróficas son los ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico, etc.), la mayoría de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, los aminoácidos (alanina, asparagina, aspartato, glutamato), etanol y fructosa (Imhoff y Trüper, 1991).

Las fuentes de nitrógeno preferidas por el *R. rubrum* son las sales de amonio (cloruro de amonio) y cualquier aminoácido, y como fuente de azufre el sulfato.

Además del substrato orgánico, para el crecimiento de *R. rubrum* se requiere un medio mineral suplementado con biotina y bicarbonato.

Tipo de metabolismo	Presencia de luz	Presencia de O₂	Fuente de carbono	Fuente de electrones
fotolitoautotrófico	Sí	No	CO ₂	H ₂
fotoheterotrófico	Sí	No	Compuesto orgánico	Compuesto orgánico
heterotrófico	No	No	Compuesto orgánico	Compuesto orgánico (reducido)
quimiolitotrófico	No	Sí	CO ₂	H ₂
quimioheterotrófico	No	Sí	Compuesto orgánico	Compuesto orgánico (reducido)

Tabla 1.6: Características de los diferentes tipos de metabolismo que presentan las células de *R. rubrum*.

1.4.1. Metabolismo del Carbono

Asimilación del dióxido de carbono

La fotoasimilación autotrófica del dióxido de carbono en las bacterias púrpuras, como en la mayoría de los organismos, se produce principalmente vía el ciclo de la ribulosa difosfato. El funcionamiento de este ciclo en las bacterias púrpuras no del azufre se ha dilucidado mediante la exposición de las células durante un corto período de tiempo a productos marcados con carbono-14, y el posterior estudio de su cinética de aparición así como la presencia de la 1,5-difosfato carboxilasa con sus enzimas asociadas. La formación de productos marcados con carbono-14 a partir de ¹⁴CO₂ típicos del ciclo de la ribulosa difosfato se ha encontrado durante el crecimiento de *R. rubrum* en presencia de acetato, malato o propionato.

La presencia de compuestos orgánicos en el medio de cultivo afecta a la cantidad de CO₂ asimilado vía el ciclo de la ribulosa difosfato, y consecuentemente los niveles de ribulosa difosfato carboxilasa pueden ser menores que bajo condiciones autotróficas. No obstante, eso no necesariamente ocurre con todas las especies de bacterias púrpuras y también depende de la naturaleza del compuesto orgánico presente. Se cree que la operación del ciclo de la ribulosa difosfato en presencia de algunos compuestos orgánicos puede ser importante por el consumo del exceso de poder reductor. Pero no todos los compuestos orgánicos son capaces de satisfacer completamente las necesidades de fuente de carbono de las bacterias púrpuras. Parte de los metabolitos necesarios pueden continuar siendo formados a partir del CO₂ a través de la fotoasimilación vía el ciclo de la ribulosa difosfato y por otras rutas metabólicas, incluso en presencia de substratos orgánicos el medio de cultivo. Algunos compuestos orgánicos pueden ser metabolizados por las bacterias púrpuras sólo como consecuencia de la carboxilación.

La existencia de varias carboxilasas en las bacterias púrpuras satisface el requerimiento de éstas de dióxido de carbono para diferentes procesos metabólicos. El contenido en estas enzimas a menudo varía de unas especies a otras. Juntamente con el 3-fosfoglicerato y azúcares fosfatados, diferentes especies de bacterias púrpuras, utilizan el dióxido de carbono del medio para producir, de forma rápida y en cantidades considerables, ácidos orgánicos, como malato, succinato, aspartato y glutamato entre otros. Esto muestra que la carboxilación de compuestos C₃ derivada del 3-fosfoglicerato se da simultáneamente con la operación del ciclo de la ribulosa difosfato. La fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC. 4.1.1.31) parece estar involucrada a menudo en estas reacciones, pues esta enzima está presente en muchas bacterias púrpuras.

La carboxilación de ácidos orgánicos y sus derivados acil-CoA pueden también ser de gran importancia en las bacterias púrpuras cuando utilizan algunos substratos orgánicos, particularmente para enzimas cuya acción está relacionada con ferredoxinas. Algunas carboxilasas, denominadas sintasas, han sido descubiertas en bacterias púrpuras, bacterias verdes y en algunas bacterias quimiotróficas estrictamente anaerobias. La piruvato sintasa, que cataliza la formación de piruvato a partir de acetyl-CoA y dióxido de carbono es la más difundida entre estas especies. En algunas bacterias púrpuras del azufre que tienen una capacidad limitada para oxidar los compuestos orgánicos a través de una vía como la asimilación del acetato es

particularmente importante. En algunas bacterias púrpuras, y especialmente en *R. rubrum*, el metabolismo del propionato está relacionado con la participación de otra enzima carboxiladora, la propionil-CoA carboxilasa que depende de la biotina. Así pues, la presencia de diferentes carboxilasas en bacterias púrpuras es importante para la síntesis de varios metabolitos, particularmente de algunos ácidos orgánicos y aminoácidos. También es probable que no todas las carboxilasas estén involucradas en la fotoasimilación del dióxido de carbono.

Se ha observado en el crecimiento de *R. rubrum* en ácidos C₄-dicarboxílicos que la fosfopiruvato carboxiquinasa afecta a la producción de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato, el cual se utiliza para la síntesis de carbohidratos así como otros componentes celulares.

La ribulosa difosfato carboxilasa de las bacterias púrpuras, de manera similar a la de otros organismos, no sólo cataliza la fijación del dióxido de carbono sino que también presenta funciones de oxigenasa:



Esto explica la producción de glicolato en presencia de oxígeno en las bacterias púrpuras, al igual que en otros microorganismos autótrofos.

Metabolismo de compuestos orgánicos C_n

En general, las bacterias púrpuras son capaces de utilizar durante la fotosíntesis un número considerable de compuestos que contienen más de un átomo de carbono, como alcoholes, azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Todas las bacterias púrpuras no del azufre tienen la característica de poder utilizar compuestos orgánicos de dos maneras diferentes: como donador de electrones o como fuente de carbono sin la necesidad de oxidarlos hasta dióxido de carbono.

Alcoholes

Se ha observado que la oxidación del isopropanol a acetona está ligada a la asimilación del dióxido de carbono. Este hecho evidencia la característica de que los alcoholes pueden servir como fuente de electrones en la fotosíntesis. Pero, en muchos casos los alcoholes son sometidos a más oxidaciones, formándose ácidos orgánicos que pueden participar en procesos de biosíntesis o bien ser parcialmente oxidados a dióxido de carbono.

Azúcares

De entre muchos azúcares, las bacterias púrpuras utilizan preferentemente glucosa y/o fructosa; por ejemplo, *R. rubrum* sólo utiliza fructosa. Es bastante probable que la ausencia del sistema de transporte correspondiente haga que muchas bacterias no puedan utilizar muchos azúcares externos. Esta suposición está de acuerdo con el hecho de que las bacterias púrpuras sean capaces de descomponer el glicano endógeno acumulado como producto de reserva.

Muchas especies de bacterias púrpuras, de acuerdo con su actividad enzimática, catabolizan los azúcares a través de la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (figura 1.12). Esta actividad se ha confirmado en *R. rubrum* a través de la utilización de fructosa marcada con carbono-14. El crecimiento de este microorganismo en fructosa, al igual que otras bacterias púrpuras, está relacionado con la inducción de la 1-fosfofructoquinasa. Esto significa que el metabolismo de la fructosa empieza con la formación de fructosa-1-fosfato en vez de fructosa-6-fosfato, como se produce en muchos otros organismos.

Ácidos orgánicos

La utilización de ácidos orgánicos es una característica común de muchas bacterias púrpuras y para muchas especies son el mejor sustrato.

Los ácidos orgánicos utilizados por las bacterias púrpuras no del azufre son ácidos grasos saturados (hasta C₉), ácidos di- y tri- carboxílicos y hidroxí- y cetoácidos (de C₃ a C₆). Muchas especies utilizan acetato, piruvato, malato, succinato y fumarato; también son utilizados lactato, propionato y butirato.

Algunas bacterias púrpuras son capaces de asimilar aminoácidos no sólo como fuente de nitrógeno, sino que también como fuente de carbono.

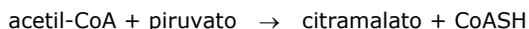
Se han realizado muchos estudios sobre el metabolismo del acetato, especialmente en *R. rubrum*. La utilización de acetato empieza con la formación de acetil-CoA, catalizada por la acetil-CoA sintasa. El acetil-CoA puede estar involucrado en diferentes reacciones en función de las especies bacterianas y del medio de cultivo. En cultivos de bacterias púrpuras donde la fuente de carbono es acetato se observa la rápida formación de aminoácidos, especialmente aspartato y glutamato. A parte de los aminoácidos, también se forman compuestos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como succinato, malato, fumarato y citrato.

La presencia de todas las enzimas necesarias del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en muchas especies de bacterias púrpuras no del azufre confirma la existencia de este ciclo (figura 1.12).

El ciclo del glioxilato también está activo en algunas bacterias púrpuras, pero no en *R. rubrum* porque no contiene isocitrato liasa o malato sintasa. A la vez, se ha comprobado que la alanina producida por el *R. rubrum* en presencia de acetato ha sido sintetizada a partir del dióxido de carbono.

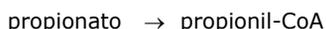
El análisis de glutamato y aspartato aislados de proteínas del *R. rubrum* después del consumo de [¹⁴C]-acetato en presencia de bicarbonato no marcado ha demostrado que el dióxido de carbono también se utiliza en la síntesis de estos aminoácidos. Así pues, está claro que el fotometabolismo de acetato en *R. rubrum* implica no sólo reacciones del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

En todas las bacterias púrpuras, cuando se utiliza [¹⁴C]-acetato, se produce citramalato como uno de los primeros productos marcados. Esto es a causa de la acción de la piruvato transacetilasa que cataliza la siguiente reacción:

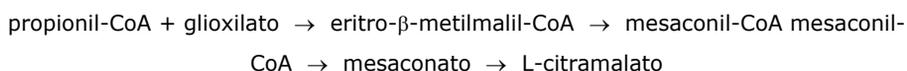


También hay otra ruta del metabolismo del acetato ampliamente distribuida en las bacterias púrpuras. Esta ruta consiste en la producción de polihidroxitbutirato a partir de acetato. Este proceso empieza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA.

En *R. Rubrum* la utilización del propionato está relacionada con la carboxilación del propionil-CoA, según las reacciones:



Se ha observado que extractos de células de *R. rubrum* también catalizan las siguientes reacciones:



Muchas bacterias púrpuras utilizan para su crecimiento lactato, oxidándolo a piruvato mediante la acción de la lactato deshidrogenasa. El piruvato es uno de los compuestos utilizados para la mayoría de las bacterias púrpuras. Varias bacterias púrpuras tienen la capacidad de fosforilarlo, de acuerdo con la siguiente reacción:



El fosfoenolpiruvato resultante puede ser utilizado para la síntesis de carbohidratos o estar sometido a carboxilación, con la formación de oxalacetato mediante la acción de diferentes enzimas. En algunas especies de bacterias púrpuras, la carboxilación del piruvato es posible a través de la acción de la piruvato carboxilasa. También se puede dar la producción de alanina a partir de piruvato y citramalato.

En *R. rubrum* se ha observado que la actividad de la piruvato deshidrogenasa está relacionada con el NAD. También se ha identificado la capacidad de degradación del piruvato con la participación de piruvato:ferrodoxin:oxidoreductasa. *R. rubrum* es capaz de degradar el piruvato en la oscuridad bajo condiciones anaerobias con la participación de la piruvato formato liasa.

La asimilación de los ácidos dicarboxílicos, malato, fumarato y succinato es seguida, generalmente, por la producción de dióxido de carbono. A la vez, experimentos con $^{14}\text{CO}_2$ muestran la fijación del dióxido de carbono en presencia de estos ácidos, aunque la cantidad mayoritaria de carbono asimilado por las células proviene de los mismos ácidos dicarboxílicos.

La utilización del malato por las bacterias púrpuras parece estar relacionada en muchos casos con su conversión en ácido oxaloacético, funcionando como fuente de fosfopiruvato y otros productos.

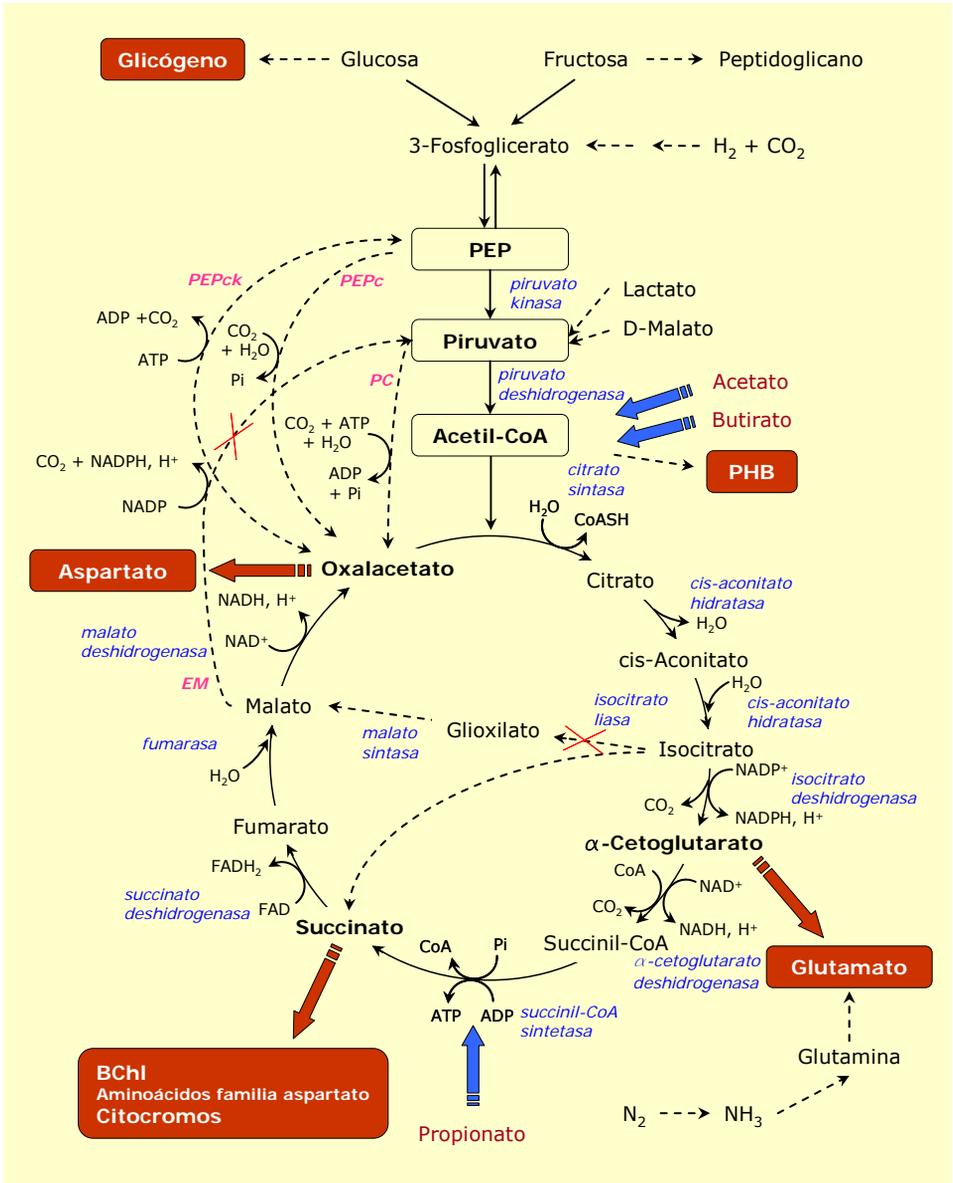


Figura 1.12: Rutas metabólicas principales (vía Embden-Meyerhoff-Parnas y ciclo de los ácidos tricarboxílicos) implicadas en la asimilación de los ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato) en *Rhodospirillum rubrum*. También están representadas las reacciones anapleróticas susceptibles de estar en funcionamiento en esta bacteria: PC (piruvato carboxilasa), PEPc (PEP carboxilasa), PEPck (PEP carboxiquinasa), EM (enzima málica).

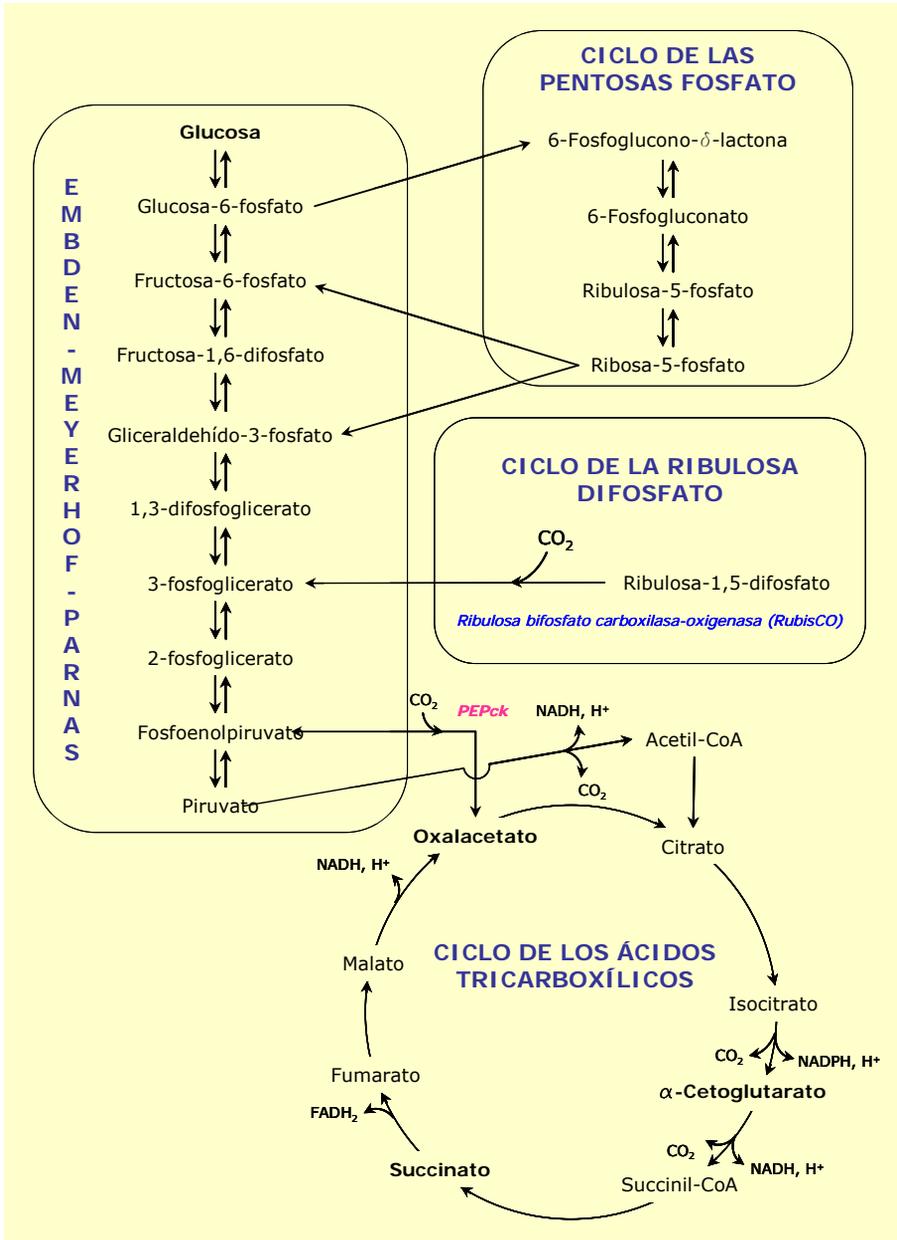


Figura 1.13: Rutas metabólicas más importantes del metabolismo del carbono (Vía Embden-Meyerhoff-Parnas o glucólisis, ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, ciclo de la ribulosa difosfato o ciclo de Calvin-Benson y ciclo de las pentosas fosfato). También está representada la reacción anaplerótica catalizada por la PEP carboxiquinasa (PEPck).

También hay evidencias del metabolismo del succinato en las bacterias púrpuras. Para muchas especies de estos microorganismos es característica la presencia de succinato deshidrogenasa relacionada con el aparato fotosintético, aunque la actividad de esta enzima es normalmente baja. Preparaciones que contienen pigmentos (cromatóforos), con la participación de la succinato-deshidrogenasa adherida a la membrana, oxidan el succinato en presencia de luz produciendo NAD reducido como resultado del flujo reverso de electrones. Este proceso asegura la asimilación del dióxido de carbono por las células vía el ciclo de la ribulosa difosfato. El fumarato producido por el *R. rubrum* como resultado de la oxidación del succinato puede ser convertido posteriormente e independientemente de la luz en malato y algunos otros compuestos. En *R. rubrum* es posible otra vía para la utilización del succinato a causa de la disponibilidad de α -cetoglutarato sintasa, que cataliza la carboxilación del succinil-CoA.

Investigaciones del fotometabolismo del fumarato revelan que células y preparaciones de extractos de células de *R. rubrum* son capaces de convertir fumarato en succinato y malato. Se ha observado en presencia de luz la producción extensiva de succinato a partir de fumarato.

Metabolismo anaerobio en la oscuridad

Se conoce que las bacterias púrpuras tienen la capacidad bajo condiciones anaerobias en la oscuridad de llevar a cabo una "autofermentación" de sustratos orgánicos endógenos con la producción de ácidos orgánicos, dióxido de carbono e hidrógeno. En la actualidad se conoce claramente que estos sustratos son polihidroxibutirato y glicano de reserva que pueden estar acumulados en la célula en grandes cantidades.

Vías anapleróticas

Las vías anapleróticas son todas aquellas rutas metabólicas cuya finalidad consiste en la síntesis de aquellos intermediarios, básicamente pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que mediante las reacciones de biosíntesis se han derivado hacia la formación de células.

Existe una gran variedad de vías diferentes que cumplen con este objetivo, de las cuales se destacan las siguientes a título de ejemplo:

- la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc)
- la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPck)
- la piruvato carboxilasa (PC)
- la enzima málica (EM)
- el ciclo del glioxilato

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc)

Esta enzima cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) a oxalacetato (figura 1.12). Buchanan *et al.* (1967) demostraron que esta enzima esta presente en las células de *R. rubrum*.

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPck)

Esta enzima cataliza la descarboxilación reversible de oxalacetato a fosfoenolpiruvato (figura 1.12 y figura 1.13). Ha sido encontrada en cepas de *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*. Aparentemente parece ser que esta vía sólo funciona para producir fosfoenolpiruvato. Willison (1988) ha demostrado que el acetato es un activador de esta enzima.

La piruvato carboxilasa

Esta enzima cataliza la carboxilación irreversible del piruvato a oxalacetato (figura 1.12). Esta vía juega un papel central en la regeneración de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos a partir de piruvato (Willison, 1988).

La enzima málica

Esta enzima cataliza la formación de malato a partir de piruvato (figura 1.12) y su actividad ha sido detectada en *R. rubrum* (Iwakura, 1978).

El ciclo del glioxilato

Durante la oxidación de ácido acético o ácidos grasos que se convierten en acetyl-CoA sin la formación intermedia de piruvato, ocurre una modificación especial del ciclo de los ácidos tricarbónicos conocida como ciclo del glioxilato (figura 1.12). Bajo estas circunstancias no puede generarse oxalacetato a partir de piruvato o fosfoenolpiruvato ya que en los microorganismos que crecen en condiciones aeróbicas no existe un mecanismo que sintetice piruvato a partir de acetato. El oxalacetato requerido para la oxidación del acetato se repone mediante la oxidación de succinato y malato, que se produce por una secuencia de dos reacciones. En la primera reacción el isocitrato, que es un intermediario normal del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos, se rompe para dar succinato y glioxilato. En la segunda reacción el acetil-CoA se condensa con el glioxilato para formar malato, el precursor inmediato del oxalacetato (figura 1.14). Así, el ciclo del glioxilato actúa como una secuencia anaplerótica que permite el funcionamiento normal del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En el ciclo del glioxilato intervienen dos enzimas, la isocitrato liasa y la malato sintasa. Diferentes trabajos han demostrado que *R. rubrum* no puede producir la isocitrato liasa cuando crece en acetato (Ivanovsky *et al.*, 1997), por lo que este ciclo está inactivo en su interior. No obstante, *R. rubrum* es capaz de crecer en un medio con acetato como única fuente de carbono a pesar de la falta de esta vía. Este hecho hace pensar que esta célula posea un mecanismo alternativo para reponer los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Porter y Merrett (1970) propusieron una vía para la formación de glioxilato y de propionato a partir de α -hidroxiglutarato. Ivanovski (1997a; 1997b; Filatova *et al.*, 2005; Meister *et al.*, 2005) ha propuesto la oxidación del acetato a glioxilato a través del ciclo del citramalato (figura 1.14). Las enzimas que participan en este ciclo son: citramalato sintasa, que cataliza la condensación del acetil-CoA y del piruvato para formar el citramalato, y la 3-metilmalil-CoA liasa, que cataliza la rotura de 3-metilmalil-CoA en glioxilato y propionil-CoA.

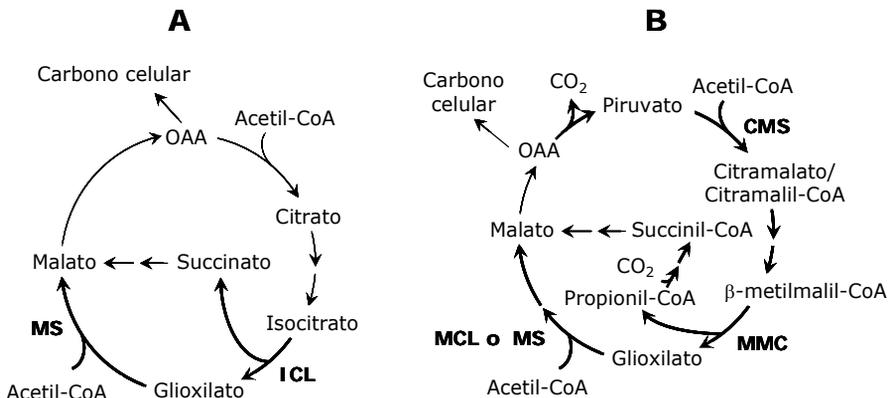


Figura 1.14: Rutas conocidas y propuestas para la asimilación del acetato. (A) Ciclo del glioxilato. Las reacciones en las que intervienen las enzimas clave ICL –isocitrato liasa- y MS –malato sintasa- están diferenciadas con trazo más grueso. (B) Ciclo del citramalato propuesto por Ivanovsky. Las reacciones catalizadas por enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos están representadas con trazo más fino. Las enzimas claves propuestas son la citramalato sintasa (CMS), β -metilmalil-CoA liasa (MMC) y MS o MCL (malil-CoA liasa). No está determinado si el

producto de la reacción catalizada por la CMS es citramalato o bien citramalil-CoA. OAA: oxalacetato.

1.4.2. Metabolismo del Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos esenciales en la composición de las células, puesto que está presente en la constitución de los aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, etc.

R. rubrum, como el resto de cepas del género *Rhodospirillaceae*, es capaz de asimilar el amonio como única fuente de nitrógeno, independientemente de la fuente de carbono que utilice. Aunque el amonio es la fuente de nitrógeno preferida, otros compuestos de nitrógeno, orgánicos e inorgánicos, también pueden ser utilizados (Gicqueau, 1993; Viprey, 1994).

Bajo condiciones específicas de crecimiento, especialmente en ausencia de amonio, el nitrógeno molecular, el nitrito y el nitrato pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno inorgánico (Madigan *et al.*, 1984).

Los aminoácidos pueden ser utilizados como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno orgánico. *R. rubrum* puede crecer utilizando la urea como fuente de nitrógeno, sea cual sea la fuente de carbono.

Fijación de nitrógeno molecular

La fijación del nitrógeno consiste en la reducción del nitrógeno molecular a amonio, mediante un complejo enzimático llamado nitrogenasa, a través del siguiente esquema de reacción:



La fijación del nitrógeno molecular es muy costosa en términos de equivalentes de energía biológica, pues se requiere una gran cantidad tanto de poder reductor como de ATP. Durante esta reacción de catálisis, se produce una obligada reducción de protones en la que se genera un mol de hidrógeno molecular por mol de nitrógeno molecular reducido (Halbleib y Ludden, 2000).

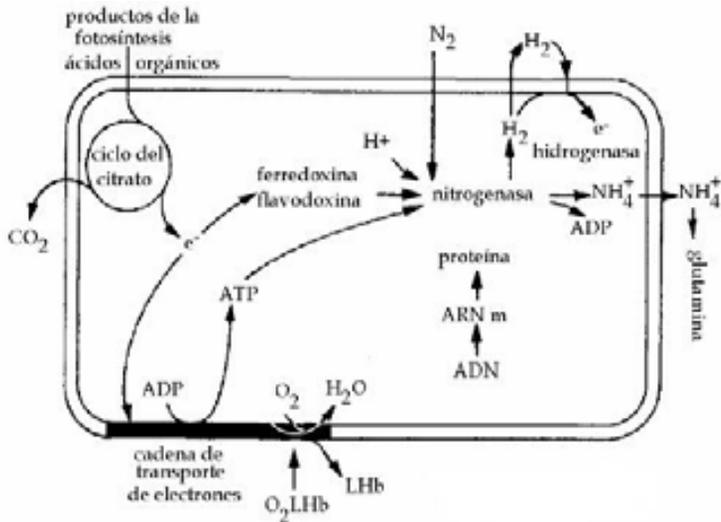


Figura 1.15: Metabolismo de fijación del nitrógeno molecular mediante la nitrogenasa (Carrillo, 2003).

La nitrogenasa es un heterodímero formado por una subunidad grande y otra pequeña. La subunidad grande está compuesta a su vez por cuatro subunidades polipeptídicas iguales dos a dos, mientras que la subunidad pequeña está compuesta a su vez por dos subunidades aparentemente idénticas. Ambas subunidades de la nitrogenasa contienen átomos de hierro y azufre, conteniendo además molibdeno la subunidad grande. La presencia de molibdeno y hierro en el medio es uno de los factores que influye en la actividad del enzima. La nitrogenasa se destruye en presencia de oxígeno (en particular la subunidad pequeña, dejando inactiva al complejo enzimático).

Una descripción detallada de los aspectos fisicoquímicos y genéticos de la fijación del nitrógeno molecular en los *Rhodospirillaceae* está presente en el trabajo realizado por Ludden y Roberts (1995).

Fijación de nitrógeno amoniacal

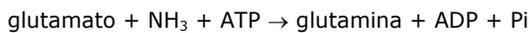
El amonio es la forma utilizada de forma preferente por las células de *R. rubrum* como fuente de nitrógeno, por lo que es muy habitual su incorporación en los medios de cultivo sintéticos como cloruro de amonio, NH_4Cl , o sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El amonio puede ser incorporado por la célula directamente, mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH ó glutamina oxo-glutarato amino-transferasa):



Glutamato deshidrogenasa (GDH)

o bien indirectamente a través de dos reacciones consecutivas (GS-GOGAT). La primera es catalizada por la glutamina sintetasa (GS) y la segunda por la glutamato sintetasa (GOGAT):



Glutamina sintetasa (GS)



Glutamina oxo-glutarato aminotransferasa (GOGAT)

Cuando el medio de cultivo es rico en iones amonio, la primera reacción, catalizada por la GDH, es la que se da preferentemente.

Asimilación de nitrato

En general, aquellos microorganismos capaces de asimilar el ión nitrato realizan una reducción en dos etapas. En un primer paso reducen el nitrato a nitrito gracias a la nitrato reductasa y en una segunda etapa el nitrito es convertido en amonio mediante la nitrito reductasa. Cabe destacar que los microorganismos que son capaces de crecer usando el nitrato como fuente de nitrógeno es porque poseen los dos tipos de enzimas.

En *R. rubrum* el sistema enzimático utilizado para la asimilación del ión nitrato es inhibido por el ión amonio o por el glutamato.

En la figura 1.16 se representa un esquema general del metabolismo del nitrógeno del *R. rubrum* en el que se pueden apreciar las reacciones involucradas cuando las fuentes de nitrógeno son nitrógeno molecular, nitrato, amonio y glutamato.

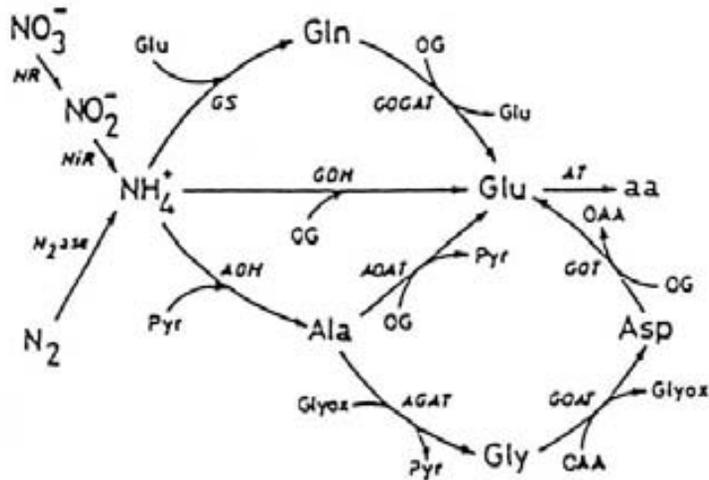


Figura 1.16: Metabolismo del nitrógeno del *R. rubrum*. (aa): aminoácido; (ADH): alanina deshidrogenasa; (AGAT): alanina glicoxilato aminotransferasa; (AOAT): alanina oxoglutarato aminotransferasa; (GDH): glutamato deshidrogenasa; (GOAT): glicina oxaloacético aminotransferasa; (GOGAT): glutamato sintetasa; (GOT): glutamato oxaloacético transaminasa; (GS): glutamina sintetasa; (NIR): nitrito reductasa; (NR): nitrato reductasa; (N_2ase): nitrogenasa. (Christiansen, 1991a).

1.4.3. Asimilación de Fósforo y Azufre

El fósforo es un elemento esencial en la composición de la célula, puesto que forma parte de los ácidos nucleicos, de las membranas fosfolipídicas y de moléculas principales del metabolismo energético como el ATP y formas similares.

Las fuentes de fósforo pueden ser tanto orgánicas como el ión fosfato. En el primer caso, la enzima fosfatasa alcalina es la encargada de hidrolizar el fósforo orgánico a ión fosfato. Durante el proceso de asimilación de este nutriente, el fósforo no es ni oxidado ni reducido, a diferencia de lo que ocurre con el nitrógeno o con el azufre.

El azufre es un elemento básico en la composición celular, formando parte de los aminoácidos sulfurados. Brune (1995) ha constatado que todas las especies *Rhodospirillaceae* pueden crecer en presencia de luz con sulfuro de hidrógeno (H_2S) o con azufre elemental como donador de electrones. En la figura 1.17 se pueden

apreciar esquematizadas las vías metabólicas que utiliza *R. rubrum* para oxidar el sulfuro de hidrógeno a sulfato así como las principales enzimas implicadas.

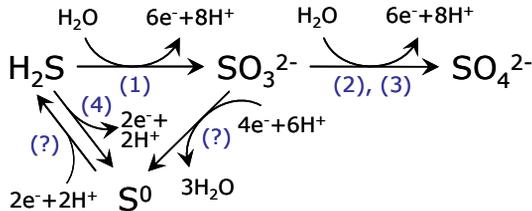


Figura 1.17: Reacciones de oxidación del sulfuro de hidrógeno en *R. rubrum*. Las enzimas involucradas se indican mediante los números entre paréntesis: (1) sulfito reductasa; (2) APS reductasa; (3) oxidoreductasa; (4) sulfuro quinona reductasa; (?) enzimas que aún no han sido identificadas. (Brune, 1995).

El ión sulfato también puede ser una fuente de azufre utilizada por *R. rubrum*. El sulfato es transportado activamente dentro de la célula donde es reducido. La reducción completa del sulfato en sulfuro necesita 8 electrones además de la catálisis enzimática de varias reacciones que consumen una elevada cantidad de energía.

El sulfuro es incorporado en la célula generalmente como cisteína, la cual es utilizada para formar metionina y el resto de biomoléculas que contienen azufre.

La reducción del sulfato es cara desde el punto de vista energético, por lo que la fuente de azufre preferida es el sulfuro.

1.4.4. Metabolismo energético

Introducción

La fotosíntesis es un conjunto de reacciones biológicas a través de las cuales los organismos fotótrofos (bacterias fotosintéticas, cianobacterias, algas y plantas superiores) son capaces de transformar la energía de la radiación electromagnética en energía química (ATP y poder reductor), que puede ser después utilizada para llevar a cabo las reacciones de biosíntesis que la consumen, incluyendo la reducción del dióxido de carbono a compuestos orgánicos.

La capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis depende de la presencia de pigmentos especiales que tienen la capacidad de captar la luz, llamados clorofilas. La absorción de los fotones por estos pigmentos inicia el proceso de la conversión fotosintética de la energía.

El crecimiento de un organismo fotosintético se puede caracterizar por dos conjuntos diferentes de reacciones: las reacciones que tienen lugar en la fase iluminada, en las cuales la energía lumínica se convierte en energía química, y las reacciones que tienen lugar sin que intervenga la luz, en las que la energía química se utiliza en reducir el dióxido de carbono en compuestos orgánicos.

Los *Rhodospirillaceae* utilizan la energía lumínica para producir energía química en forma de ATP. Los electrones para la reducción del dióxido de carbono provienen del NADPH, el cual ha sido producido a su vez a partir de sustancias reductoras presentes en su ambiente, como pueden ser compuestos orgánicos, sulfuro de hidrógeno (H₂S) o hidrógeno molecular. Este proceso recibe el nombre de fotosíntesis anoxigénica, porque para producir NADPH no hace falta romper moléculas de agua y no se produce oxígeno molecular como subproducto.

Todas las bacterias que llevan a cabo la fotosíntesis anoxigénica poseen un solo fotosistema (PS), similar al fotosistema I (PS1) de las plantas superiores (Thornber *et al.*, 1983).

Estructura y funcionamiento del aparato fotosintético

El aparato fotosintético de las bacterias púrpuras está alojado dentro de la célula en sistemas intracitoplásmicos de la membrana. Está compuesto de tres unidades funcionales: los pigmentos antena, los centros de reacción y el sistema de transporte de electrones, el complejo *citocromo BC₁*.

Las bacterias púrpuras contienen la bacterioclorofila *a*, que tiene el máximo de absorción aproximadamente en 870 nm (figura 1.18). Se ha comprobado que relativamente pocas bacterioclorofilas participan activamente en la conversión de energía lumínica en ATP. Estas moléculas especiales de bacterioclorofilas que realizan la conversión energética se conocen con el nombre de centros de reacción, y reciben la energía por transferencia de las otras bacterioclorofilas que captan la luz, llamadas pigmentos antena.

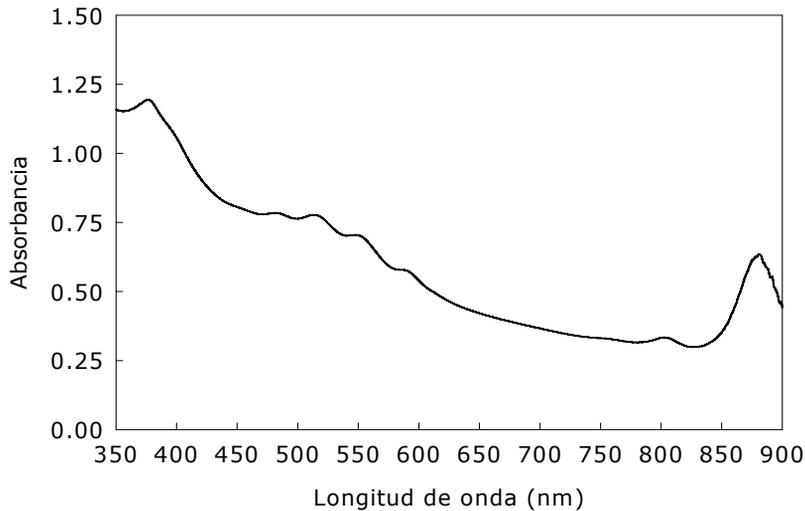


Figura 1.18: Espectro de absorción de la luz de células de *R. rubrum*. Los picos a 870, 805 y 360 nm corresponden a las bacterioclorofilas. Los picos a 525 y 550 son provocados por los carotenoides.

El aparato fotosintético de las bacterias púrpuras consta de cuatro complejos pigmento-proteína asociados a la membrana, más una ATPasa compleja que permite la síntesis del ATP a expensas de un gradiente de fotones. Tres de los cuatro complejos específicos para la fotosíntesis son el centro de reacción, los captadores de luz I (LH I -*Light harvesting I*-) y las antenas captadoras de luz II (LH II). El cuarto complejo del aparato fotosintético, el complejo citocromo BC_1 , es común en el flujo respiratorio de electrones fotosintético.

El centro de reacción se ha podido cristalizar y se ha determinado su estructura mediante resolución atómica por difracción de rayos X (Brock *et al.*, 1991; Jamieson *et al.*, 2002). Contiene tres polipéptidos, llamados subunidades L, M y H, los cuales están firmemente introducidos en la membrana fotosintética y atraviesan varias veces la membrana. Estas proteínas se fijan al centro de reacción del complejo fotoquímico, que consta de dos moléculas de bacterioclorofilas *a*, llamadas *par especial*; dos moléculas adicionales de bacterioclorofilas *a*, que reciben el nombre de bacterioclorofilas *visoras* y que su función no está dilucidada aún claramente; dos

moléculas de bacteriofeofitina (bacterioclorofilas *a* sin su átomo de Mg) y dos moléculas de quinona.

Flujo fotosintético de electrones

El centro de reacción está rodeado de dos moléculas antena de bacterioclorofilas *a* que captan la luz, las cuales funcionan como un embudo, dirigiendo la energía lumínica hacia el centro de reacción. La energía lumínica se transfiere de las antenas al centro de reacción en paquetes que reciben el nombre *excitones*, que son estados electrónicos móviles que migran a través de las antenas al centro de reacción con elevada eficacia. En experimentos con membranas fotosintéticas nativas (intactas) se ha demostrado que esta elevada eficacia está íntimamente relacionada con la disposición espacial de todos los componentes del aparato fotosintético (Hu *et al.*, 1998; Fotiadis *et al.*, 2003; Scheuring *et al.*, 2004).

La fotosíntesis se inicia cuando la energía del *excitón* pasa al *par especial* de moléculas bacterioclorofilas *a*. La absorción de la energía excita al *par especial* convirtiéndolo en un reductor energético, suficientemente potente como para reducir a una molécula aceptora de potencial muy bajo.

Antes de la excitación, el centro de reacción tiene un E_0' de +0.5 V y después de la excitación tiene un potencial de -0.7 V, suficiente como para reducir la bacteriofeofitina *a* (figura 1.19). A continuación, el electrón excitado dentro del *par especial* reduce una molécula de bacteriofeofitina *a* en el centro de reacción. Esta transición se lleva a cabo a una velocidad muy elevada, alrededor de 35-45 ps (Fotiadis *et al.*, 2003). Una vez reducida, la molécula de bacteriofeofitina *a* reduce a una molécula de quinona, la cual forma parte del centro de reacción pero está realmente más cerca de la superficie externa que de la membrana fotosintética. La quinona se considera el aceptor primario de electrones. De la quinona, los electrones son transportados en la membrana a través de una serie de proteínas que contienen azufre y citocromos, volviendo finalmente al centro de reacción. Las proteínas clave del transporte de electrones incluyen el citocromo BC_1 y el citocromo *C*.

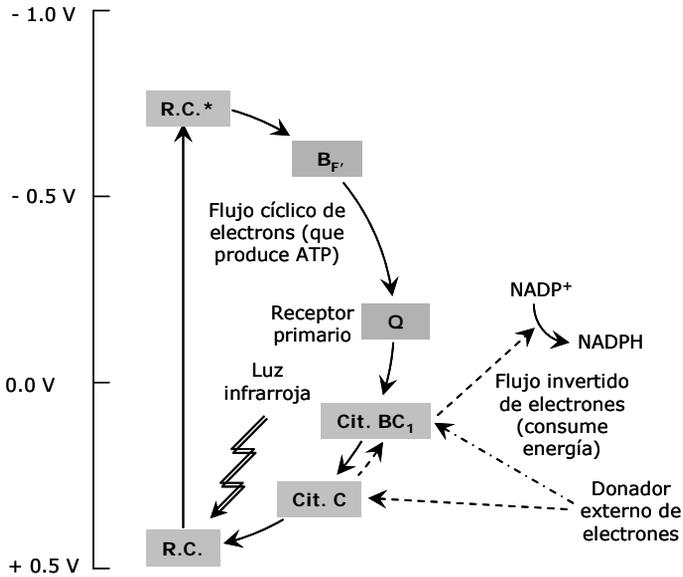


Figura 1.19: Flujo de electrones en la fotosíntesis anoxigénica. R.C.: bacterioclorofila del centro de reacción; B_F : bacteriofeofitina; Q: quinona; Cit.: citocromo.

Fotofosforilación

La síntesis de ATP durante el flujo fotosintético de los electrones se produce como resultado de la formación de un gradiente de electrones, generado por la expulsión de protones durante el transporte de protones y la actividad de las ATPasas al acoplar la disipación del gradiente de protones con la formación de ATP. La reacción en serie finaliza cuando el citocromo C devuelve el electrón al *par especial* de bacterioclorofilas, el cual sirve para devolver a estas moléculas su estado basal original ($E_0' = +0.5V$). Entonces, el centro de reacción es capaz de absorber una nueva cantidad de energía y repetir todo el proceso. Este método de producción de ATP se conoce bajo el nombre de *fotofosforilación cíclica*, a causa de que los electrones se mueven repetidamente alrededor de un círculo cerrado. En la fotofosforilación cíclica no hay consumo ni generación de electrones como ocurre en el proceso de la respiración.

En la figura 1.20 se muestran las relaciones espaciales de los componentes del transporte de electrones en la membrana fotosintética. Los protones son bombeados

al centro de la membrana del cromatóforo, estableciéndose así el gradiente de protones que se utiliza en la síntesis del ATP. El resultado neto de la reacción lumínica es la traslocación de tres protones a través de la membrana por cada electrón excitado fotoquímicamente. El gradiente de protones es utilizado en el flujo inverso de electrones para generar NADPH. Por tanto, el papel único y fundamental de la luz es la creación de un reductor energético; el resto de reacciones que se producen a continuación no dependen de la luz y se producen porque son termodinámicamente favorables en el sentido de transferencia de electrones.

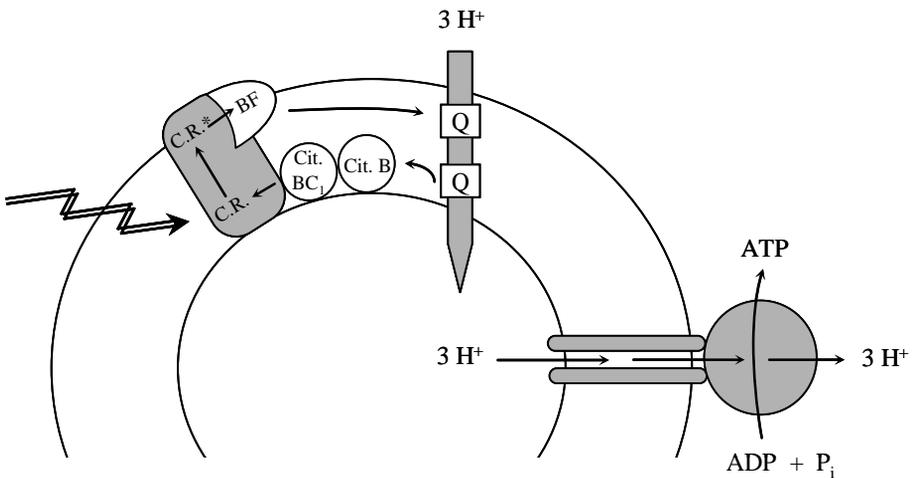


Figura 1.20: Flujo de electrones y traslocación de protones en la membrana fotosintética. El gradiente de protones generado por la luz se utiliza en la síntesis de ATP, vía la ATPasa asociada a la membrana.

1.4.5. Biosíntesis de macromoléculas

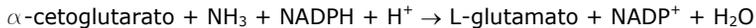
El número de macromoléculas, coenzimas y grupos prostéticos necesarios para la síntesis celular está alrededor de 75-100, y éstos se sintetizan a partir de los 12 precursores metabólicos formados en las rutas biosintéticas (Ingraham *et al.*, 1983).

A continuación, se presentan las rutas metabólicas que *R. rubrum* utiliza para la síntesis de las macromoléculas más relevantes: aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

Síntesis de proteínas

Los aminoácidos son las unidades constituyentes de las proteínas y probablemente ésta es la función más importante de los 20 L-aminoácidos más frecuentemente encontrados en las células. No obstante, los aminoácidos también sirven como precursores para la síntesis de otras macromoléculas y metabolitos secundarios importantes.

El primer paso en la síntesis de los aminoácidos consiste en la asimilación de nitrógeno, mediante el cual el nitrógeno, en forma de amoníaco, es fijado e incorporado en moléculas orgánicas. Esto ocurre primeramente con la biosíntesis del aminoácido L-glutamato a partir de α -cetoglutarato:



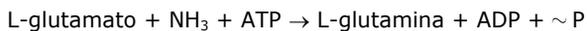
Esta reacción está catalizada por la NADP glutamato deshidrogenasa (GDH).

Otra vía para la biosíntesis del L-glutamato es la ruta GS-GOGAT, que consta de dos etapas. En la primera, la L-glutamina dona un grupo amino al α -cetoglutarato, formando dos moléculas de L-glutamato:



Esta reacción está catalizada por la enzima glutamato sintasa (GOGAT).

La segunda etapa es la regeneración de la L-glutamina mediante la siguiente reacción:



Esta reacción está catalizada por la glutamina sintasa (GS). La suma de estas dos reacciones es la síntesis neta de L-glutamato a partir de α -cetoglutarato, similar a la reacción catalizada por la GDH aunque con el matiz importante de que en ésta última se gasta energía, puesto que un ATP es hidrolizado por cada L-glutamato formado. La ruta GS-GOGAT es un sistema de alta afinidad para la asimilación del amoníaco y está principalmente activo para bajas concentraciones de amoníaco, mientras que la GS está reprimida a moderadas concentraciones de amoníaco.

Las rutas biosintéticas de los 20 aminoácidos más comunes han sido dilucidadas para la mayoría de procariontes y un resumen general se esquematiza en la figura 1.21 (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

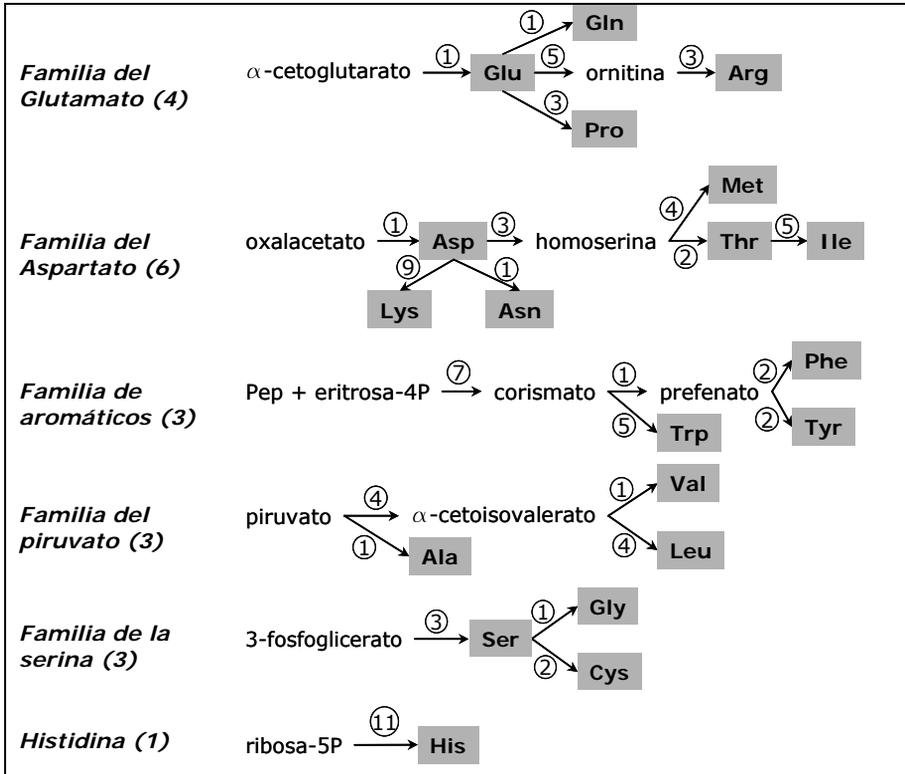


Figura 1.21: Esquema de la biosíntesis de los aminoácidos en las bacterias. Los aminoácidos han sido clasificados en 5 familias de acuerdo con el metabolito precursor específico o aminoácido que sirve como punto inicial para su síntesis. Los números dentro del círculo indican el número de reacciones de la vía metabólica. Ala: Alanina; Arg: Arginina; Asn: Asparagina; Asp: Aspartato; Cys: Cisteína; Gln: Glutamina; Glu: Glutamato; Gly: Glicina; His: Histidina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Lys: Lisina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Thr: Treonina; Trp: Triptófano; Tyr: Tirosina; Val: Valina. (Stephanopoulos *et al.*, 1998)

En la tabla 1.7 se recoge el coste metabólico que le supone a una bacteria la síntesis de los distintos aminoácidos.

Capítulo 1 - Introducción

Aminoácido	Metabolitos Precusores ^a	ATP ^b	NADH	NADPH	1-C ^c	NH ₃	S ^d
L-Alanina	1 pyr	0	0	-1	0	-1	0
L-Arginina	1 α kg	-7	1	-4	0	-4	0
L-Asparagina	1 oaa	-3	0	-1	0	-2	0
L-Aspartato	1 oaa	0	0	-1	0	-1	0
L-Cisteína ^e	1 pga	-4	1	-5	0	-1	-1
L-Fenilalanina	2 pep, 1 eryP	-1	0	-2	0	-1	0
L-Glicina	1 pga	0	1	-1	1	-1	0
L-Glutamato	1 α kg	0	0	-1	0	-1	0
L-Glutamina	1 α kg	-1	0	-1	0	-2	0
L-Histidina	1 penP	-6	3	-1	-1	-3	0
L-Isoleucina	1 oaa, 1 pyr	-2	0	-5	0	-1	0
L-Leucina	2 pyr, 1 acCoA	0	1	-2	0	-1	0
L-Lisina	1 pyr, 1 oaa	-3	0	-4	0	-2	0
L-Metionina	1 oaa	-7	0	-8	-1	-1	-1
L-Prolina	1 α kg	-1	0	-3	0	-1	0
L-Serina	1 pga	0	1	-1	0	-1	0
L-Tirosina	2 pep, 1 eryP	-1	1	-2	0	-1	0
L-Treonina	1 oaa	-2	0	-3	0	-1	0
L-Triptófano	1 pep, 1 eryP, 1 penP	-5	2	-3	0	-2	0
L-Valina	2 pyr	0	0	-2	0	-1	0

Tabla 1.7: Coste metabólico de la biosíntesis de los aminoácidos en las bacterias (Stephanopoulos et al., 1998).

^aacCoa: acetil-CoA; eryP: eritrosa-4-fosfato; oaa: oxalacetato; penP: ribosa-5-fosfato; pep: fosfoenolpiruvato; pga: 3-fosfoglicerato; pyr: piruvato; α kg: α -cetoglutarato.

^bEn las reacciones en las que el ATP es hidrolizado a AMP, se ha considerado el gasto de dos ATPs. ^c5,10-metilentetrahidrofolato es usado como molécula que cede un átomo de carbono, la cual se convierte en tetrahidrofolato. Otras formas de tetrahidrofolato utilizadas en la biosíntesis de L-metionina y L-histidina son convertidas a esta base.

^dLa fuente de azufre supuesta de el sulfato, el cual es reducido a sulfuro de hidrógeno, etapa previa a su asimilación.

^eEs asumida una sulfhidrilación directa de la L-serina.

En la tabla 1.8 se muestra la riqueza relativa de cada aminoácido en las proteínas de *Rb. capsulata*.

Aminoácido	Fórmula	Peso molecular (kg/kmol)	Contenido % (mol/mol proteína)
L-Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	71	12.82
L-Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	156	6.21
L-Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	114	1.13
L-Aspartato	C ₄ H ₇ NO ₄	115	8.42
L-Cisteína ^e	C ₃ H ₇ NO ₂ S	103	0.49
L-Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	147	3.87
L-Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	57	7.89
L-Glutamato	C ₅ H ₉ NO ₄	129	8.92
L-Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	128	1.03
L-Histidina	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	137	1.98
L-Isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113	4.94
L-Leucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113	8.43
L-Lisina	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	128	4.81
L-Metionina	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	131	2.6
L-Prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	97	5.98
L-Serina	C ₃ H ₇ NO ₃	87	3.93
L-Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	163	2.32
L-Treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	101	5.57
L-Triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	186	1.31
L-Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	99	7.36

Tabla 1.8: Contenido en aminoácidos de las proteínas de *Rb. capsulata*. (Kobayashi y Kurata, 1978)

Teniendo en cuenta la composición en aminoácidos de las proteínas y las fórmulas de éstos, se puede calcular la composición elemental media de las proteínas para las bacterias en general, que sería: CH_{1.59}N_{0.29}O_{0.35}S_{0.007}.

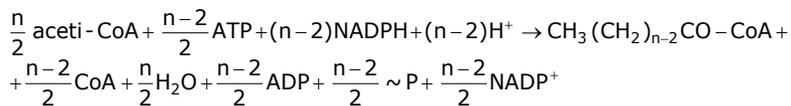
Síntesis de carbohidratos

El bloque constituyente de los carbohidratos más relevante para su síntesis y almacenamiento es la UDP-glucosa. Esta molécula se forma a partir de la glucosa-1-fosfato por pirofosforilación. Cuando la hexosa se ha incorporado al polímero UDP es liberada, y el coste general de añadir una hexosa monofosfato a una cadena de carbohidratos es, por lo tanto, de un UDP (equivalente a un ATP). En la tabla 1.9 se resumen los costes metabólicos de la síntesis de los carbohidratos.

Síntesis de lípidos

Los lípidos son un grupo heterólogo de compuestos que incluye acilgliceroles, fosfolípidos y esteroides. El componente principal de estos lípidos son los ácidos grasos, los cuales están presentes en los acilgliceroles, en los fosfolípidos y en los ésteres de esteroides. Los ácidos grasos mayoritarios son el ácido palmítico (C16:0), el ácido palmitoleico (C18:1), el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linoléico (C18:3).

La biosíntesis de los ácidos grasos saturados se produce por adiciones sucesivas de dos átomos de carbono a una forma activa de acetil-CoA. Los átomos de carbono son donados por el malonil-CoA, que se forma por la carboxilación del acetil-CoA. La ecuación estequiométrica global para la biosíntesis de una cadena grasa de acil-CoA es:



Otros bloques constitutivos de los componentes de los lípidos son el glicerol-3-fosfato, el cual supone la columna vertebral de la síntesis de los fosfolípidos y triacilgliceroles, el radical alcohol de los fosfolípidos y los esteroides. El glicerol-3-fosfato se deriva directamente de la dihidroxiacetona-fosfato de la glucólisis. En la tabla 1.9 se recogen los costes metabólicos de la síntesis de los lípidos.

Bloque constituyente	Metabolitos Precusores ^a	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH ₃
UDP-glucosa	1 gluP	-1	0	0	0	0
Glicerol-3-fosfato	1 gly P	0	-1	0	0	0
Palmitoil-CoA	8 acCoA	-7	0	-14	0	0
Palmitoleoil-CoA	8 acCoA	-7	0	-14	0	0
Estearoil-CoA	9 acCoA	-8	0	-16	0	0
Oleoil-CoA	9 acCoA	-8	1	-16	0	0
Linoleoil-CoA	9 acCoA	-8	2	-16	0	0
Linolenoil-CoA	9 acCoA	-8	3	-16	0	0

Tabla 1.9: Coste metabólico para la biosíntesis de los carbohidratos y lípidos (Stephanopoulos et al., 1998). ^aacCoa: acetil-CoA; gluP: glucosa-6-fosfato; glyP: gliceraldehido-3-fosfato.

Síntesis de ácidos nucleicos

Los nucleótidos en la forma de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos son los bloques constituyentes del ARN y del ADN respectivamente, aunque también desempeñan otras funciones dentro de la célula. También son los constituyentes de cofactores, como es el caso del NADH, NADPH, FAD y CoA, y de moléculas como el ATP.

Los nucleótidos están compuestos de tres partes: una base nitrogenada heterocíclica, que puede ser una purina o una pirimidina; un azúcar (ribosa en el ARN y 2-desoxirribosa en el ADN) y un grupo fosforilo. Las bases del DNA son adenina (A) y guanina (G) –las purinas– y tiamina (T) y citosina (C) –las pirimidinas–. En el caso del ARN, la tiamina es substituida por un grupo uracil (U).

Los desoxirribonucleótidos (dAMP, dGMP, dUMP y dCMP) están formados a partir de los ribonucleótidos (AMP, GMP, UMP y CMP) reemplazando el grupo 2'-OH por un hidrógeno (donado por un NADPH), y dTMP se forma por metilación de dUMP. Los nucleótidos son sintetizados a partir de la ribosa-5-fosfato y 3-fosfoglicerato, en el caso de la biosíntesis de las purinas, y a partir oxalacetato, en el caso de las pirimidinas. En la tabla 1.10 se recogen los costes metabólicos de la biosíntesis de los nucleótidos.

Nucleótido	Metabolitos	ATP	NADH	NADPH	1-C	NH ₃
	Precursores ^a					
AMP	1 pga, 1 penP	-9	3	-1	-1	-5
GMP	1 pga, 1 penP	-11	3	0	-1	-5
UMP	1 oaa, 1 penP	-5	0	-1	0	-2
CMP	1 oaa, 1 penP	-7	0	-1	0	-3
dAMP	1 pga, 1 penP	-9	3	-2	-1	-5
dGMP	1 pga, 1 penP	-11	3	-1	-1	-5
dTMP, dUMP	1 oaa, 1 penP	-5	0	-3	-1	-2
dCMP	1 oaa, 1 penP	-7	0	-2	0	-3

Tabla 1.10: Coste metabólico para la biosíntesis de los nucleótidos (Stephanopoulos et al, 1998).
^aoaa: oxalacetato; penP: ribosa-5-fosfato; pga: 3-fosfoglicerato.

1.4.6. Metabolismo de reserva

Introducción

En función del modo de cultivo y/o de las condiciones fisicoquímicas, el crecimiento no está orientado a la formación de nuevas células; una fracción de la fuente de carbono y de la energía se deriva hacia el mantenimiento y hacia el almacenamiento de reservas celulares.

Las células de *R. rubrum* son capaces de acumular reservas intracelulares, que son utilizadas tanto como fuente de energía como de carbono para hacer frente así a momentos en que las condiciones exteriores no son favorables. Los principales polímeros que acumulan estas células son dos compuestos ricos en carbono: glicógeno y β -polihidroxibutirato (PHB) y uno rico en fósforo, el polifosfato (Dawes, 1986).

El hecho de que se acumule una u otra reserva de carbono depende de la relación entre la energía (ATP) y el poder reductor (NAD), así como del tipo de sustrato. Los sustratos que conducen a la formación de piruvato son la fuente preferencial para la síntesis de glicógeno, mientras que los sustratos que conducen a la síntesis de acetil-CoA, como intermediario del piruvato, conducen preferentemente a la formación de PHB (Sojka, 1978).

Glicógeno

El glicógeno es un polisacárido ramificado formado de unidades de glucosa unidas por dos enlaces α -1,4-glucosídicos en los tramos lineales y por enlaces α -1,6-glucosídicos en las ramificaciones. Su peso molecular es elevado, del orden de 10^7 daltons, e interfiere levemente en la presión osmótica interna de la célula (Ballicora *et al.*, 2003).

Las principales fuentes de carbono que favorecen la síntesis de glicógeno son el piruvato, el malato, el succinato y el lactato (Stanier *et al.*, 1959). Esta síntesis se produce en mayor grado cuando el crecimiento está limitado por alguna otra fuente (nitrógeno, azufre o fósforo).

El glicógeno acumulado puede ser degradado en caso de limitación del crecimiento por carbono.

Biosíntesis de glicógeno

La biosíntesis de glicógeno en las células de *R. rubrum* está esquematizada en la figura 1.22. La síntesis consta de tres etapas: una etapa inicial, seguida de la etapa de crecimiento de la cadena y finalmente la etapa de ramificación, que conduce a una molécula final altamente ramificada. Esta etapa hace intervenir a la enzima ADP-glucosa fosforilasa, proteína que regula la síntesis de glicógeno en la mayoría de bacterias (Preiss, 1984). Esta regulación ha sido ampliamente estudiada (Preiss, 1981; Preiss, 1984; Ballicora *et al.*, 2003).

En las células de *R. rubrum* el principal activador de la ADP-glucosa fosforilasa es el piruvato (Preiss, 1981) y ningún metabolito conocido la inhibe.

El crecimiento de la cadena inicial es catalizada por la glicógeno sintetasa, la cual transfiere un residuo glicosil de la ADP-glucosa al extremo no reducido de una cadena de glucosas unidas por enlaces de tipo " α -1,4", con la formación de un nuevo enlace " α -1,4". Cuando la cadena de glucosas es suficientemente larga, se empiezan a producir las ramificaciones, que son catalizadas por la "enzima ramificadora", la cual establece enlaces α -1,6-glucosídicos.

Degradación de glicógeno

La degradación del glicógeno implica la acción de la glicógeno fosforilasa, enzima cuya actividad es independiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento y que es estimulada por el AMP (Merrick, 1978).

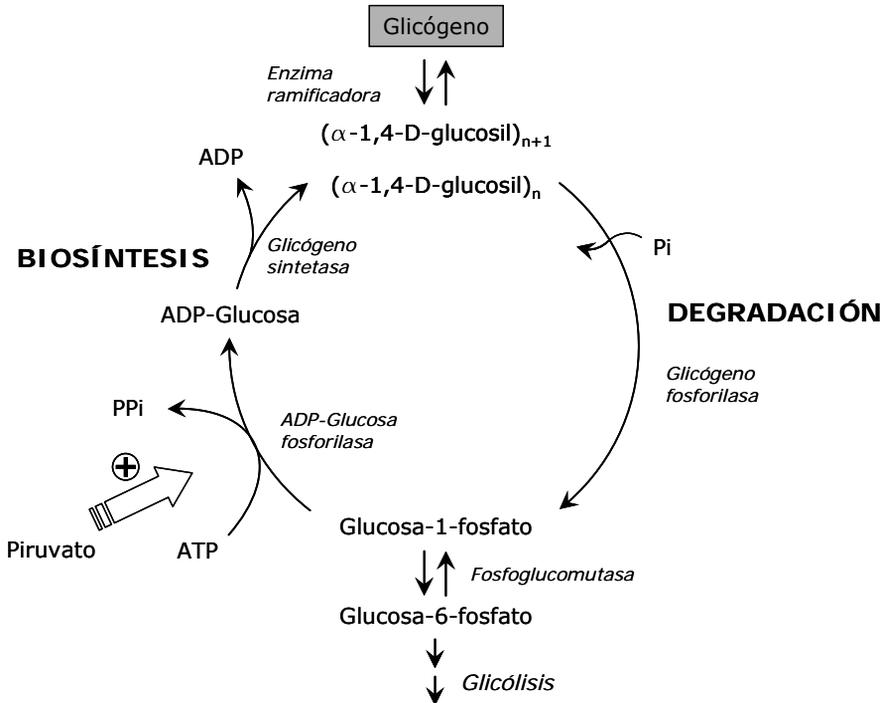


Figura 1.22: Mecanismos de síntesis y degradación del glicógeno así como su regulación en células de *R. rubrum*.

Polihidroxicanoatos (PHAs)

Introducción

Los poli(3-hidroxicanoatos) (PHAs) son macromoléculas estructuralmente simples sintetizadas por un gran número de bacterias gram-positivas y gram-negativas, entre las cuales, se encuentra el *R. rubrum*. Los PHAs son acumulados como gránulos discretos, en ocasiones hasta un 90% del peso seco de la célula, y desempeñan un papel de reserva de carbono y de equivalentes de reducción. Cuando los nutrientes

disponibles por la célula no están balanceados, es ventajoso para la bacteria almacenar intracelularmente el exceso de nutrientes, especialmente cuando esto no afecta al resto de sus funciones. Al polimerizar intermediarios solubles en moléculas insolubles, la célula no sufre alteraciones en su estado osmótico y previene el escape de estos valiosos componentes. Por tanto, los nutrientes almacenados estarán disponibles a un coste de mantenimiento relativamente bajo (Madison y Huisman, 1999).

Los PHAs han atraído considerablemente el interés académico e industrial en las dos últimas décadas por sus propiedades termoplásticas y su biodegradabilidad. Como monómeros constituyentes de los PHAs se han identificado sobre unos 150 hidroxialcanoatos diferentes al 3-hidroxi butirato (3HB), aunque el PHA sintetizado con más frecuencia por las bacterias es el poli(3-hidroxi butirato). Este polímero ha sido producido a escala industrial bajo el nombre comercial de BIOPOL® por la empresa ICI Inc (Handrick *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista estructural, los PHAs son moléculas lineales que de cabeza a fin están integradas por poliésteres compuestos de monómeros de un ácido graso 3-hidroxi (figura 1.23). En todos los PHAs caracterizados hasta el momento, el átomo de carbono del hidroxil sustituido es de configuración *R*, excepto en casos especiales en que la molécula no es quiral. Además, en el tercer átomo de carbono (C-3) o posición β , se ha posicionado un grupo alquil el cual puede variar desde un metil (C_1) hasta un tridecil (C_{13}) (Madison y Huisman, 1999).

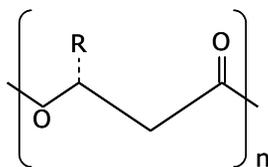


Figura 1.23: Estructura química general de los PHAs. Generalmente están compuestos de (*R*)- β -ácidos grasos hidroxil, donde el grupo *R* puede variar desde metil (C_1) hasta tridecil (C_{13}). Los PHAs mejor conocidos son P(3HB) (*R*=metil) y P(3HB-3HV) (*R*=metil o etil) (Madison y Huisman, 1999).

Aunque el poli-3-hidroxi butirato es el PHA sintetizado con más frecuencia por *R. rubrum*, esta bacteria es capaz de almacenar otros polímeros diferentes. De hecho, se han encontrado copolímeros con grupos alquilo que pueden variar desde un residuo metil hasta un grupo butil.

Biosíntesis de poli-3-hidroxicanoatos

La formación de PHAs en las células de *R. rubrum* está estimulada por el crecimiento en presencia de alcanosatos, como acetato, propionato o butirato.

Tanto la biosíntesis como la degradación de PHAs dentro de la célula se desarrolla siguiendo un mecanismo cíclico como el que se representa en la figura 1.24 para el caso del poli-3-hidroxi butirato (PHB).

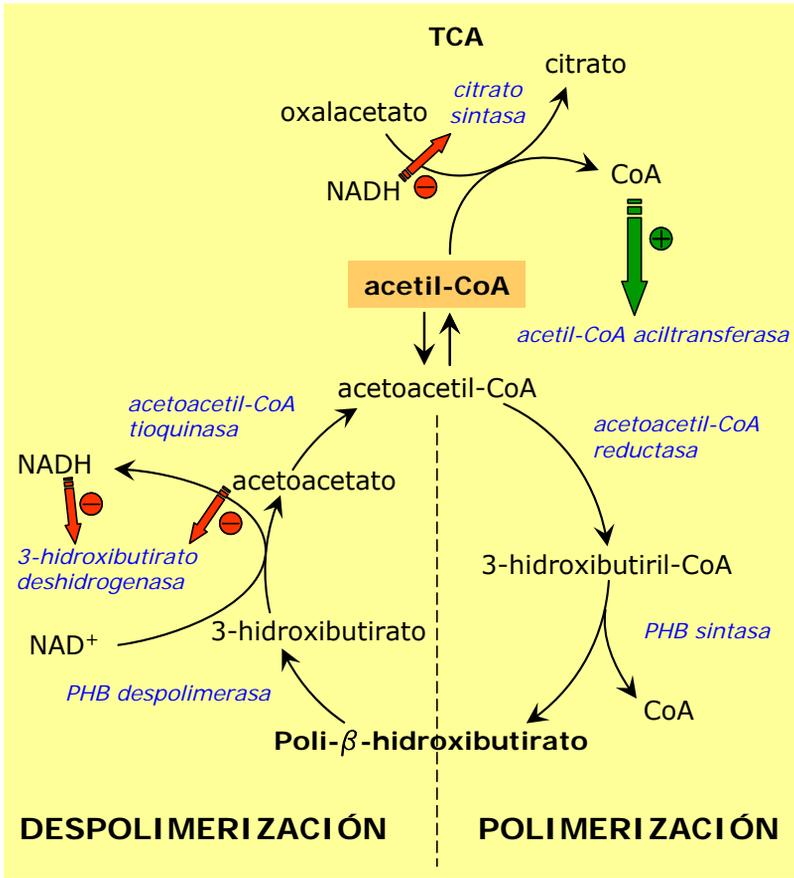


Figura 1.24: Biosíntesis y degradación de PHB. En condiciones de exceso de energía, el NADH inhibe la despolimerización de PHB y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). La disminución de la concentración de CoA-SH aumenta la inhibición de la acetil-CoA-aciltransferasa que cataliza la condensación del acetil-CoA en acetoacetil-CoA y la síntesis de PHB. En deficiencia de energía, el control actúa en el otro sentido. Los signos (+) y (-) corresponden a una regulación positiva o negativa (Byron, 1987).

La mayor parte de los estudios que han servido para dilucidar los mecanismos de formación y degradación de PHAs se han realizado con *Alcaligenes eutrophus*, puesto que esta bacteria tiene una gran facilidad para acumular este tipo de polímeros (hasta un 90% de su peso seco) y esto supone un elevado potencial de explotación a nivel industrial. Estos mismos mecanismos se han explicado para el caso de *R. rubrum* por comparación con *A. eutrophus*. En la figura 1.25 se esquematizan las rutas de síntesis de PHB y del copolímero P(HB-HV) en *Alcaligenes eutrophus*. En la formación del primero, se sintetiza PHB generalmente a partir de acetil-CoA a través de una secuencia de tres reacciones catalizadas por la 3-cetotilasa (acetil-CoA acetiltransferasa; EC 2.3.1.9), la acetoacetyl-CoA reductasa (hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; EC 1.1.1.36) y la poli(3-hidroxibutirato) sintasa.

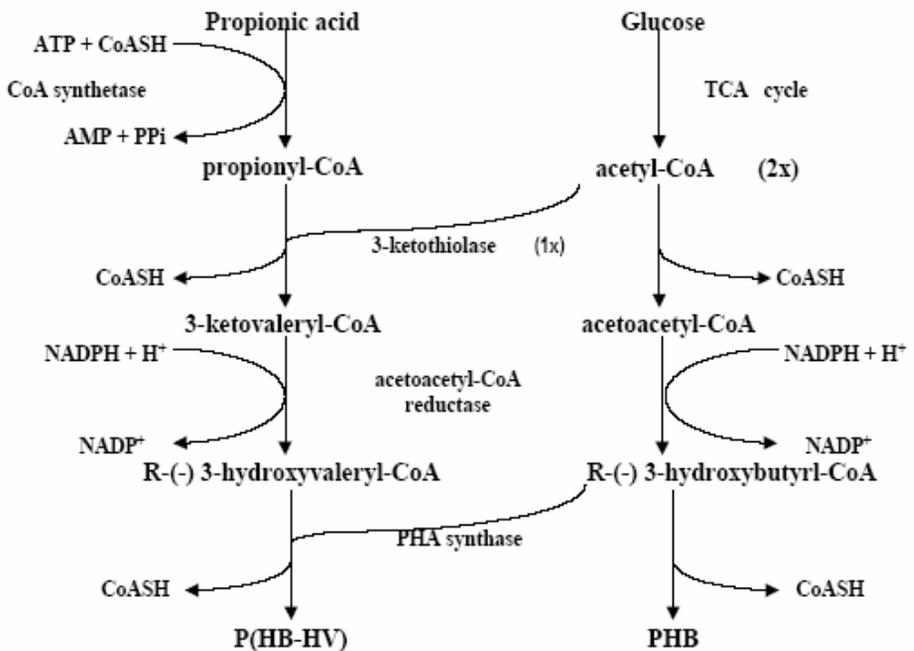


Figura 1.25: Rutas biosintéticas de PHB y P(HB-HV) en *Alcaligenes eutrophus*. (Ojumu y Solomon, 2004).

En las células de *R. rubrum* también intervienen dos hidratasas enoil-CoA estereoespecíficas. Estas enzimas catalizan la conversión de L-(+)-3-hidroxibutiril-

CoA vía crotonil-CoA en D-(-)-3-hidroxi-butiril-CoA, el cual es polimerizado para proporcionar PHB (Anderson y Dawes, 1990).

Regulación metabólica de la síntesis de poli-3-hidroxi-alcanoatos

La producción de PHAs está favorecida por la limitación de algún nutriente diferente al carbono —oxígeno, nitrógeno, fosfato, sulfato, etc.— (Hustede *et al.*, 1993).

El almacenamiento de carbono en forma de PHAs está asociado al consumo de cofactores reducidos. Cuando el crecimiento no está limitado, la síntesis celular está compitiendo con las vías de acumulación de PHAs por el NADH y el acetyl-CoA. Este último puede oxidarse mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos (y se utilizaría en la biosíntesis) o bien consumirse como sustrato para la síntesis de PHAs. Pequeñas cantidades de PHAs son producidas y degradadas en continuo durante el crecimiento celular de la mayoría de microorganismos. No obstante, en caso de estrés metabólico de la célula (limitación de algún nutriente), la célula convierte el exceso de carbono en PHAs.

El hecho de que el acetyl-CoA sea dirigido al ciclo TCA o hacia la síntesis de PHAs estriba en las condiciones ambientales, especialmente cuando la limitación por oxígeno hace que la relación NADH/NAD⁺ aumente. El NADH inhibe las enzimas citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, logrando que el acetyl-CoA no entre de igual modo en el ciclo TCA y entonces es convertido en acetoacetyl-CoA por la 3-cetotiolasa, la primera enzima de la ruta biosintética del PHB, la cual es inhibida por el cofactor CoA-SH. Por tanto, bajo estas condiciones, el flujo de carbono que pasa a través del ciclo TCA disminuye considerablemente. Cuando la relación NADH/NAD⁺ se invierte (por ejemplo, porque se aumenta el suministro de oxígeno) la concentración de CoA-SH aumenta y el acetyl-CoA vuelve a entrar en el ciclo TCA, a la vez que la enzima 3-cetotiolasa es convenientemente inhibida y se suspende la síntesis de PHB. Senior y Dawes (1971) han propuesto que el PHB no sólo sirve como reserva de carbón y de energía, si no que también funciona como un depósito de poder reductor y puede, por tanto, ser considerado como un mecanismo de regulación redox de la célula.

Degradación de los poli-3-hidroxicanoatos

Las reacciones de degradación del polímero de reserva se inician después del agotamiento de las fuentes de carbono exógenas.

Tal y como se puede observar en la figura 1.24, la primera etapa de la degradación de los PHAs está catalizada por la PHB despolimerasa y conduce a la formación de D(-)-3-hidroxiacetato (Anderson y Dawes, 1990). Después, la acción de la D(-)-3-hidroxiacetato deshidrogenasa, el D(-)-3-hidroxiacetato se convierte en acetoacetato, el cual es transformado en acetoacetyl-CoA por la acetoacetyl-CoA sintasa. El acetoacetyl-CoA es un intermediario común en las vías de síntesis y degradación de PHB. La enzima D(-)-3-hidroxiacetato deshidrogenasa está considerada como la enzima clave de la degradación del PHB a nivel celular. Esta enzima es inhibida por el acetoacetato y por el NADH.

Composición de los poli-3-hidroxicanoatos sintetizados

Brandl y sus colaboradores (1989) han probado que *R. rubrum* es capaz de almacenar PHAs formados por hidroxicanoatos de entre 4 y 6 átomos de carbono a partir de sustratos consistentes en alcanos de entre 2 y 10 átomos de carbono.

Generalmente, la longitud de la cadena de carbonos del sustrato determina el rango de las unidades de monómero incorporadas en el polímero. La mayoría de 3-hidroxicanoatos que constituyen la cadena del polímero poseen la misma longitud de cadena de carbonos que la que tenía el sustrato. Es probable que la ruta de síntesis de PHAs a partir de hidroxi-3-alcanoatos sea no degradativa. Así, el ácido *n*-alcanoico es convertido en el correspondiente CoA-éster, oxidado a enoil-CoA e hidratado para proporcionar el 3-hidroxiacetyl-CoA, el sustrato de la PHA sintasa (Anderson y Dawes, 1990).

La acumulación de PHA que contienen moléculas de 3-hidroxiácido con $n-2$ átomos de carbono a partir un alcano de n átomos de carbono puede ser fácilmente explicada por la oxidación- β del acil-CoA. De forma similar, la acumulación de un polímero que contiene una proporción de hidroxiácidos $n+2$ puede resultar de la condensación de una molécula de acetyl-CoA con el acil-CoA derivado del sustrato. En cambio, es más complejo explicar la presencia de trazas de hidroxiácidos con $n+1$ ó $n-1$ átomos de carbono, cuando el sustrato tiene n átomos de carbono. Probablemente, las reacciones generales del metabolismo de los ácidos grasos pueden estar involucradas (Anderson y Dawes, 1990).

Cabe tener en cuenta que en ocasiones la composición de los PHAs producidos por *R. rubrum* ha sufrido variaciones considerables en relación al sustrato del cual han sido derivados. Gros *et al.* (1989) han constatado que *R. rubrum* es capaz de almacenar PHAs conteniendo un 30% (molar) de 3-hidroxipentanoato a partir del ácido 4-pentenoico como sustrato, cuando el monómero con más representación en el PHA formado es el 3-hidroxicaperoato (60% molar) y también se ha detectado la presencia de 3-hidroxibutirato (10% molar).

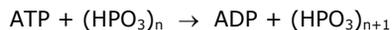
Polifosfatos

Los polifosfatos han sido identificados dentro de un amplio número de bacterias, normalmente en forma de gránulos intracelulares.

Los polifosfatos son polímeros lineales de ortofosfatos que tienen una cadena de longitud variable (de 3 a 1000 monómeros). Su función principal dentro del metabolismo de la célula es de reserva de fosfato, el cual será utilizado en la síntesis de ácidos nucleicos y de fosfolípidos en caso de que el crecimiento esté limitado por fósforo (Dawes, 1986).

A pesar de que el papel de estas reservas está bien definido, los mecanismos de acumulación y de degradación de polifosfatos en las bacterias púrpuras no del azufre se han estudiado muy poco.

Dawes (1986) ha constatado que en las bacterias la síntesis de polifosfatos está catalizada por una ATP-polifosfato fosfotransferasa (polifosfato kinasa) dependiente del ión Mg^{2+} , a través de la siguiente reacción:



De forma general, su síntesis tiene lugar durante la fase exponencial de crecimiento, cuando los fosfatos están en exceso, y consume el material acumulado en condiciones de limitación por fosfatos o de inactivación celular.

1.5. Transmisión de la radiación

1.5.1. Conceptos básicos de radiación. Magnitudes y unidades.

¿Qué es la luz? Aristóteles (384-322 A.C.) pensaba que la luz consistía en "corpúsculos" que emanaban del ojo para iluminar el mundo. Actualmente, estamos más de acuerdo con la teoría de la mecánica cuántica (por ejemplo, Hecht y Zajac, 1987) o quizás con la posibilidad de que la luz pueden ser vibraciones en la quinta dimensión de un hiperespacio de diez dimensiones (Kaku, 1994).

En cualquier caso, está físicamente comprobado que la luz es radiación electromagnética. Lo que nosotros vemos como luz visible es solamente una fracción muy pequeña del espectro electromagnético, el cual se extiende desde ondas de radio de muy baja frecuencia, pasando por las microondas, el infrarrojo, el visible y el ultravioleta hasta los rayos X y los rayos γ . Nuestros ojos sólo responden a la luz visible y para detectar el resto del espectro se requieren muchos instrumentos científicos, desde receptores de radio hasta contadores de centelleo.

Una descripción rigurosa y exacta de la radiación electromagnética y su comportamiento requiere un minucioso conocimiento de electrodinámica cuántica y de las ecuaciones del campo electromagnético de Maxwell. Existe una vasta bibliografía que explica los aspectos físicos de la luz desde el punto de vista de la radiación electromagnética (Kopal, 1991; Stark y Lubensky, 1997). En el trabajo aquí presentado se persiguen objetivos más concretos: fundamentalmente se trata de medir la iluminación efectuada en los fotobiorreactores empleados. Para ello se introducen a continuación una serie de aspectos básicos en este sentido, dada su posterior utilización a lo largo de este trabajo.

Radiometría

La radiometría es la ciencia que mide la luz en cualquier porción del espectro electromagnético. En la práctica, normalmente el término está referido a la medida del infrarrojo, visible y ultravioleta utilizando instrumentos ópticos.

Existen dos campos básicos en el estudio de la radiometría: la teoría y la práctica. La práctica incluye la instrumentación científica y los materiales utilizados en la medida de la luz (termopares de radiación, bolómetros, fotodiodos, tintes y emulsiones fotosensibles, fototubos de vacío, etc.). La teoría incluye los fundamentos físicos que describen la propagación de la luz en el vacío y en medios participativos.

Energía radiante

La luz es energía radiante. La radiación electromagnética (la cual puede ser considerada como una onda y como una partícula, en función de cómo se mida) transporta energía a través del espacio. Cuando la luz es absorbida por un objeto físico, su energía es transformada en alguna otra forma. Por ejemplo, un horno microondas calienta un vaso de agua cuando la radiación microondas es absorbida por las moléculas del agua. La energía radiante de las microondas se convierte en calor. De forma similar, la luz visible causa una corriente eléctrica al impactar con un fotómetro cuando su energía radiante es transferida a los electrones como energía cinética.

La energía radiante, expresada como Q , se mide en joules.

Energía radiante espectral

Una fuente de banda ancha (como el Sol) emite radiación electromagnética a lo largo de todo el espectro electromagnético, desde ondas de radio hasta rayos γ . No obstante, la mayoría de su energía radiante está concentrada dentro de la fracción visible del espectro. Por el otro lado, un láser que emite en una sola longitud de onda, es una fuente monocromática y toda su energía radiante es emitida en una longitud de onda específica.

La energía radiante espectral se puede definir como la cantidad de energía radiante por unidad de intervalo de longitud de onda λ . Se define como:

$$Q_\lambda = dQ/d\lambda$$

La energía radiante espectral se mide en joules por nanómetro.

Flujo radiante (potencia radiante)

La energía por unidad de tiempo es potencia, la cual se mide en joules por segundo o vatios. Un haz de rayos láser, por ejemplo, posee una cierta cantidad de vatios en forma de potencia radiante. El flujo radiante se define como:

$$\Phi = dQ/dt$$

Donde Q es la energía radiante.

En términos de un fotómetro que mide la luz visible, la intensidad eléctrica instantánea producida es proporcional al flujo radiante. La cantidad total de corriente medida durante un periodo de tiempo es directamente proporcional a la energía radiante absorbida por el fotómetro durante ese periodo de tiempo.

Flujo radiante espectral

El flujo radiante espectral es el flujo radiante por unidad de intervalo de longitud de onda. Se mide en vatios por nanómetro y se define como:

$$\Phi_\lambda = d\Phi/d\lambda$$

Densidad de flujo radiante o irradiancia

La densidad de flujo radiante es el flujo radiante por unidad de área en un punto de una superficie, donde ésta puede ser real o imaginaria (un plano matemático, por ejemplo), y también se denomina irradiancia. Se define como:

$$\psi = d\Phi/dA$$

Donde ψ es la densidad de flujo radiante incidente en un punto y dA es el diferencial de área que engloba al punto.

Cabe subrayar que la superficie puede ser real o imaginaria, lo que hace que la irradiancia incidente puede ser medida en cualquier punto del espacio tridimensional. Esto incluye en la superficie de un cuerpo, en el interior de un cuerpo o en el interior de un medio transparente como aire o agua.

La irradiancia se mide en vatios por metro cuadrado (W/m^2).

Densidad de flujo radiante espectral

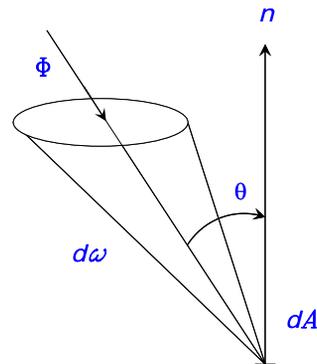
La densidad de flujo radiante espectral es el flujo radiante por unidad de intervalo de longitud de onda. También recibe el nombre de irradiancia espectral, se mide en vatios por metro cuadrado y nanómetro y se define como:

$$d\psi_{\lambda} = d\psi / d\lambda$$

Radiancia

El concepto de radiancia se visualiza en el esquema adjunto. Si se considera un rayo de luz incidiendo en un punto de una superficie en una dirección concreta, la radiancia es la cantidad infinitesimal de flujo radiante contenido en ese rayo.

Un rayo se puede considerar como un cono elemental (infinitamente estrecho) con su vértice en un punto de una superficie real o imaginaria. Este cono tiene un diferencial de ángulo sólido $d\omega$, medido en estereorradianes. También se tiene que tener presente el ángulo en el que el rayo incide en la superficie. Si el área de la intersección entre el rayo y la superficie tiene una sección dA , la sección del rayo es $dA \cos\theta$ donde θ es el ángulo entre el rayo y la superficie normal. Considerando pues un cono diferencial $d\omega$ que contiene un rayo de luz que incide en una superficie, la definición de la radiancia es:



$$\xi = d^2\Phi / [dA(d\omega \cos \theta)]$$

Donde Φ es el flujo radiante, dA es el diferencial de área alrededor del punto, $d\omega$ es el diferencial de ángulo sólido del cono elemental y θ es el ángulo entre el rayo incidente y la superficie normal n en ese punto.

Otra forma de entender la radiancia consiste en tener presente que la densidad de flujo radiante (o irradiancia) en un punto de una superficie debido a un único rayo que incide con un ángulo θ respecto a la superficie normal es $d\Phi / (dA \cos \theta)$. La radiancia en ese punto para el mismo ángulo es pues $d^2\Phi / [dA(d\omega \cos \theta)]$ o la irradiancia por unidad de ángulo sólido.

Radiancia espectral

La radiancia espectral es la radiancia por unidad de intervalo de longitud de onda. Se mide en vatios por metro cuadrado, por estereorradián y por nanómetro y se define como: $\xi_\lambda = d^3\Phi / [dA(d\omega \cos \theta)d\lambda]$.

Intensidad radiante

Dado un foco emisor de luz infinitamente pequeño el cual emite flujo radiante en todas las direcciones, la cantidad de flujo radiante emitido en una dirección concreta puede ser representada por un rayo de luz contenido en un cono elemental. Teniendo en cuenta esto, se puede definir la intensidad radiante como:

$$\zeta = d\Phi / d\omega$$

Donde $d\omega$ es el diferencial de ángulo sólido del cono elemental en una dirección concreta. A partir de la definición de ángulo sólido ($d\omega = dA/r^2$), se obtiene:

$$\psi = d\Phi/dA = d\Phi/(r^2 d\omega) = \zeta/r^2$$

Donde el diferencial de área dA está en la superficie de una esfera con centro en el foco emisor y de radio r . ψ es la irradiancia en esta superficie. En general, el flujo radiante interceptará dA con un ángulo θ , lo cual nos lleva a la *Ley del cuadrado inverso* para focos emisores puntuales:

$$\psi = \zeta \cos \theta / d^2$$

Donde ζ es la intensidad de la fuente en una dirección concreta y d es la distancia desde la fuente emisora hasta la superficie elemental dA .

Si por otra parte se considera una superficie real o imaginaria que sea un continuo de fuentes puntuales de luz, donde cada fuente ocupa un diferencial de área dA . A un ángulo θ respecto a la superficie normal n , la fuente tiene un área proyectada igual a $dA \cos \theta$. Combinando las definiciones de radiancia e intensidad radiante, podemos obtener una definición alternativa de radiancia:

$$\xi = d\zeta / (dA \cos \theta)$$

Donde $d\zeta$ es el diferencial de intensidad radiante de la fuente puntual en una dirección concreta.

La intensidad radiante se mide en vatios por estereorradián (W/sr).

Intensidad radiante espectral

La intensidad radiante espectral es la intensidad radiante por unidad de intervalo de longitud de onda. Se mide en vatios por estereorradián y por nanómetro y se define como: $\zeta_{\lambda} = d\zeta/d\lambda$

Unidades cuánticas frente a unidades radiométricas

El hecho de que la luz presente un doble comportamiento simultáneo, como onda y como corpúsculo, hace que cuando se utilizan magnitudes relacionadas con la luz (irradiancia, radiancia, intensidad radiante, etc.), éstas se puedan expresar utilizando unidades radiométricas (en joules, vatios, etc.), si se desea enfatizar el carácter de onda, o unidades cuánticas (moles de fotones), si se quiere dar una mayor importancia al matiz corpuscular de la luz. Así pues, la irradiancia se expresa en $W \cdot m^{-2}$ si se utilizan unidades radiométricas y en moles de fotones por metro cuadrado y segundo si se expresa en unidades cuánticas. Como se ha definido que un Einstein (E) equivale a un mol de fotones, la irradiancia se expresaría en $E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Cuando se trabaja con la luz por ser ésta la desencadenante de un complejo proceso bioquímico cuyo objetivo final es la obtención de energía, es conveniente utilizar unidades cuánticas, puesto que la interacción onda-materia está cuantificada. En términos fotosintéticos, lo que caracteriza a un haz de luz no es su contenido energético sino el número total de fotones que lo componen. Por ejemplo, una bacteria fotosintética obtiene una cantidad de energía muy parecida de dos haces de luz compuestos, el primero por un mol de fotones de longitud de onda de 522 nm, y el segundo por un mol de fotones de longitud de onda de 860 nm. En unidades cuánticas ($mol \text{ de fotones} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) los dos haces son equivalentes, mientras que en unidades radiométricas ($W \cdot m^{-2}$) el haz de luz de 522 nm es mucho más importante.

Esto ocurre porque en el proceso de la fotosíntesis, el comportamiento corpuscular de la luz es el predominante. La secuencia de reacciones químicas se inicia cuando un fotón es captado por los pigmentos antena o los carotenoides y acaba excitando una molécula de bacterioclorofila y, como resultado de todo el proceso cíclico, se acaba desprendiendo un electrón. La reacción global resultante es que un fotón excita un electrón, independientemente de la energía del fotón. Cuanto más energético sea el fotón, más energía se perderá en forma de calor en el proceso.

Es por esta razón que en el presente trabajo se ha decidido expresar todas las magnitudes relacionadas con la luz en unidades cuánticas. Concretamente, para expresar la cantidad de radiación suministrada a un fotobiorreactor se utilizará la irradiancia incidente, la cual se expresará en $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (microeinsteins por metro cuadrado y por segundo).

1.5.2. Modelos de transmisión de la radiación

La energía radiante que llega al cultivo es absorbida rápidamente y en ningún caso puede ser acumulada en su interior. La energía que no es absorbida o no es utilizada en el proceso de la fotosíntesis acaba siendo disipada como energía térmica (Prokop y Ericsson, 1995) y, además, cuando se exponen las células fotosintéticas a un exceso de luz, a menudo se traduce en una disminución de su velocidad de crecimiento (Neale, 1987). Por todo esto, la energía radiante debe ser aportada de forma continua y a un nivel apropiado. Así pues, para mejorar la eficiencia de los fotobiorreactores hace falta disponer de modelos que expliquen la distribución de la luz dentro del cultivo, la cual es muy heterogénea, y nos permitan conocer la disponibilidad local de luz en cada punto, puesto que este valor será decisivo para calcular la velocidad de crecimiento.

Algunos trabajos (Ogawa, *et al.*, 1971; Prokop y Ericsson, 1995) han utilizado la intensidad de la luz incidente o la superficie iluminada por unidad de volumen como un parámetro indicador de la eficiencia de la transferencia de luz. Aunque son una primera aproximación, se ha observado que únicamente son válidos cuando la concentración de células es baja y cuando el camino óptico es corto. Además, no se tiene información sobre la distribución local de la energía radiante.

En otros estudios (Lee *et al.*, 1987; Molina Grima *et al.*, 1997) se han desarrollado modelos matemáticos que determinan la intensidad media de luz del cultivo. No obstante, se ha observado que la intensidad media de luz puede ser idéntica aún cuando las condiciones de iluminación son muy diferentes, situación que hace necesario determinar el perfil de irradiancia de forma más precisa.

También se han desarrollado modelos matemáticos más complejos basados en la energía radiante local disponible, proporcionando resultados satisfactorios al

determinar la velocidad de crecimiento de algas (Acién Fernández *et al.*, 1998; Correr y Mullikin, 1999).

Desde el punto de vista del sistema de iluminación, se han desarrollado modelos para su aplicación en sistemas con irradiación solar (Gutterman, *et al.*, 1990; Sukenik *et al.*, 1991), para fotobiorreactores planos (Ratchford y Fallowfield, 1992), para fotobiorreactores tubulares (Acién Fernández, 1997), para fotobiorreactores rectangulares y cilíndricos iluminados con un sistema externo de luces artificiales (Cornet *et al.*, 1992, 1994, 1995) y para fotobiorreactores iluminados internamente (Suth y Lee, 2002).

Si se atiende a la naturaleza del modelo, se pueden encontrar en la bibliografía desde modelos rigurosos basados en las leyes de la física de la propagación de la luz en medios participativos (Cerezo y Serón, 2003), pasando por modelos deterministas con aproximaciones a las leyes de la física (Shuster, 1905; Cornet *et al.*, 1992) hasta modelos totalmente empíricos (Suth y Lee, 2002).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es profundizar en el conocimiento del Compartimento II (fotoheterótrofo) del proyecto MELISSA con la finalidad de poder diseñar el fotobiorreactor integrante del bucle MELISSA a escala piloto. Asimismo, el conocimiento adquirido se pretende aplicar también a la optimización de la operación del compartimento.

Para poder realizar el diseño y determinar la estrategia óptima de operación es necesario determinar previamente algunos aspectos básicos:

- Influencia de la naturaleza de la luz en el crecimiento de *R. rubrum*
- Influencia de la cantidad de irradiancia incidente en el crecimiento de *R. rubrum*
- Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de *R. rubrum*.

- Estrategia óptima para cultivar de forma estable *R. rubrum* en fotobiorreactores en continuo y cuáles son los rangos de las variables de operación que permiten un comportamiento estable.
- Modelo matemático que relacione las principales variables que gobiernan el proceso (energía lumínica, fuente de carbono, concentración de células y las correspondientes cinéticas) de utilidad en el diseño y planificación de la operación del compartimento.
- Necesidades del bucle MELISSA a nivel de planta piloto para poder diseñar adecuadamente el compartimento IRRADIANCIA INCIDENTE.

La aplicación de toda la información recogida en los anteriores apartados permitirá, consiguiendo así el objetivo final de este trabajo, diseñar el compartimento II para la planta piloto MELISSA incluyendo el fotobiorreactor principal así como los equipos auxiliares necesarios (tanques de apoyo, conducciones, bombas y equipos de control e instrumentación).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepa utilizada, condiciones y medios de cultivo

La cepa utilizada en los experimentos de este trabajo fue obtenida de la *American Type Culture Collection* y se trata de *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 25903) S1H, derivada de *R. rubrum* cepa S1.

La temperatura del cultivo se ha mantenido en todos los experimentos controlada alrededor de 30 °C. En el caso de los fotobiorreactores, con una desviación media inferior a 0.2 °C y en el caso de los experimentos en botellas, con oscilaciones máximas de 1 °C. Para controlar la temperatura se ha utilizado agua a 4 °C, que circulaba por un serpentín en el caso del montaje de las botellas, y por las camisas en el caso de los fotobiorreactores. Esta agua a 4 °C también se ha utilizado para refrigerar los condensadores de los fotobiorreactores.

El pH se ha mantenido constante en los experimentos en los fotobiorreactores en 6.9 ± 0.15 , mediante la adición de NaOH (1.5 M) o HCl (1.5 M) según convenía. En el caso de los experimentos en discontinuo en botellas, a pesar de la adición del tampón MOPS, el pH varía desde 6.9 hasta 7.5-7.9, aproximadamente.

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos han sido en todos los casos de composición determinada, la cual se detalla a continuación.

En los experimentos con ácido acético llevados a cabo en el fotobiorreactor de escala laboratorio, la anaerobiosis se ha mantenido conectando el venteo del reactor a una botella en la que se burbujeaba argón. No obstante, como este montaje ocasionaba problemas operacionales que llevaban a la contaminación del reactor, en los experimentos con ácido propiónico y ácido butírico no se ha introducido argón en el reactor. En los experimentos realizados en el fotobiorreactor piloto, la cabecera del reactor ha estado presurizada (100 mbar) con argón, para asegurar la anaerobiosis a la vez que evitar la contaminación del cultivo.

En el caso de los fotobiorreactores, las muestras de cultivo han sido recogidas de la corriente de salida, llenando un tubo estéril de 10 ó 25 mL, inmerso en hielo. Esta operación se ha repetido hasta obtener el volumen de líquido o de células necesario para el análisis requerido. El tiempo necesitado para la recogida de la muestra ha variado en función de la velocidad de dilución del experimento en cuestión.

Para obtener muestras de líquido, el tubo ha sido centrifugado (14000 rpm, 20 minutos, 4 °C) para una separación inicial de las células. La muestra de líquido se coge del sobrenadante y, si no se analiza en el mismo día, se congela a -80 °C hasta el análisis.

Para obtener muestras de células, después del centrifugado, se separa el sobrenadante y se resuspenden las células en una solución salina (0.4 M NaCl, 50 mM $MgSO_4$). El proceso de centrifugado se repite en las mismas condiciones, se desprecia el sobrenadante y la muestra de células se guarda. Se repite todo este proceso hasta obtener unos 5-10 g/L de células. Esta muestra de células se liofiliza y se guarda en viales estancos hasta el análisis.

Para liofilizar las muestras de biomasa, inmediatamente después de la centrifugación, se congela rápidamente sumergiendo la muestra en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Una vez congelada la muestra de células, ésta es introducida en un compartimento del liofilizador y se hace el vacío durante 24 horas aproximadamente.

3.1.1. Medio revitalizador

La cepa se recibió liofilizada y ha sido revitalizada utilizando el medio de cultivo detallado en la tabla 3.1 y los procedimientos recomendados por la ATCC. Este medio es el R8AH (medio ATCC 550) y también se ha empleado para subcultivar de forma rutinaria los cultivos de células destinados a la preparación de inóculos.

Medio de cultivo revitalizador (R8AH)		
Ácido málico	2.500	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.250	g
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.004	g
KH ₂ PO ₄	0.600	g
K ₂ HPO ₄	0.900	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.200	g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.088	g
Citrato de hierro	0.010	g
Extracto de levadura	1.000	g
Elementos traza ⁽¹⁾	1.00	mL
Biotina ⁽²⁾	7.50	mL
Agua destilada	Hasta 1 L de disolución	

⁽¹⁾ Solución de elementos traza	
Citrato de hierro	0.3 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.002 g
H ₃ BO ₃	0.001 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.001 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ · 4H ₂ O	0.002 g
ZnSO ₄	0.001 g
EDTA-Na	0.05 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.02 g
Agua destilada	100 mL

⁽²⁾ Solución de biotina	
Biotina	0.015 g
Agua destilada	1 L

Tabla 3.1: Composición del medio de cultivo revitalizador (R8AH). En la tabla se detallan las cantidades de cada especie, referidas a un litro de disolución, que hay que añadir para la preparación del medio de cultivo.

3.1.2. Medios de cultivo de los experimentos realizados en los fotobiorreactores

El medio de cultivo utilizado en los diferentes experimentos es un medio basado en la mezcla de sales basales de Segers y Verstraete, descrita por Suhaimi y colaboradores (Suhaimi, *et al.* 1987), e incorpora las modificaciones realizadas por Albiol (1994). En función de la fuente de carbono empleada, la concentración de tampón fosfato y de bicarbonato sódico ha sido adaptada, tal y como se puede apreciar en la tabla 3.2. Cuando la fuente de carbono es ácido propiónico o ácido butírico, es necesario el aporte continuo de CO₂, o bien la presencia en solución de alguna especie que lo produzca.

Medio de cultivo experimentos fotobiorreactores				
Ácido acético	2.502	--	--	g
Ácido propiónico	--	2.058	--	g
Ácido butírico	--	--	1.836	g
NH ₄ Cl	0.761	0.761	0.761	g
Na ₂ SO ₄	0.538	0.538	0.538	g
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.020	0.020	0.020	g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.010	0.010	0.010	g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.020	0.020	0.020	g
KH ₂ PO ₄	0.200	0.200	0.200	g
K ₂ HPO ₄	0.300	0.300	0.300	g
NaHCO ₃	0.250	1.500	5.500	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.200	0.200	0.200	g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.050	0.050	0.050	g
Elementos traza ⁽¹⁾	1.00	1.00	1.00	mL
Biotina ⁽²⁾	1.00	7.50	7.50	mL
Agua destilada	Hasta 1 L de disolución			

Tabla 3.2: Composición de los medios de cultivo utilizados en los experimentos en los fotobiorreactores. El medio está detallado para 1 g C/L. La composición de la solución de elementos traza y de la solución de biotina es la reflejada en la tabla 3.1.

3.1.3. Medio de cultivo de los experimentos realizados en las botellas Roux

El medio de cultivo utilizado en los experimentos en discontinuo en las botellas Roux es similar al utilizado en los fotobiorreactores para los casos del ácido acético y del ácido propiónico, aunque difiere sensiblemente al incorporar el tampón MOPS (ácido 3-morfolipropasulfónico) para que el pH del cultivo no sufra variaciones importantes en el curso del experimento. La composición química de este medio de cultivo se detalla en la tabla 3.3, en sus dos variedades, con ácido acético y con ácido propiónico.

Medio de cultivo experimentos botellas			
Ácido acético	2.502	--	g
Ácido propiónico	--	2.058	g
NH ₄ Cl	0.761	0.761	g
Na ₂ SO ₄	0.538	0.538	g
EDTA-Na·2 H ₂ O	0.020	0.020	g
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0.010	0.010	g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.020	0.020	g
KH ₂ PO ₄	0.200	0.200	g
K ₂ HPO ₄	0.300	0.300	g
NaHCO ₃	0.250	0.670	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.200	0.200	g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.050	0.050	g
MOPS	21.00	21.00	g
Elementos traza ⁽¹⁾	1.00	1.00	mL
Biotina ⁽²⁾	1.00	7.50	mL
Agua destilada	Hasta 1 L de disolución		

Tabla 3.3: Composición de los medios de cultivo utilizados en los experimentos en las botellas Roux. El medio está detallado para 1 g C/L. La composición de la solución de elementos traza y de la solución de biotina es la reflejada en la tabla 3.1.

3.2. Fotobiorreactores utilizados

3.2.1. Fotobiorreactor escala laboratorio

Descripción general

El fotobiorreactor de escala laboratorio utilizado en los experimentos es un fotobiorreactor *Applikon*, el cual es totalmente de vidrio a excepción de la tapa superior, que es de acero inoxidable. La geometría de la cuba es cilíndrica, con una relación altura/diámetro de 1.5. Su capacidad total es de 3 L, de los que 2.4 L corresponden al volumen útil. En la tabla 3.4 se resumen las principales características físicas de la cuba y en la figura 3.1 se puede apreciar el fotobiorreactor así como el resto de equipos auxiliares.

Características físicas de la cuba	
Diámetro	0.128 m
Altura	0.19 m
Superficie	0.075 m ²
Volumen útil	2.4 L
Relación Superficie/Volumen	31.25 m ² /m ³

Tabla 3.4: Características físicas de la cuba del fotobiorreactor *Applikon*.

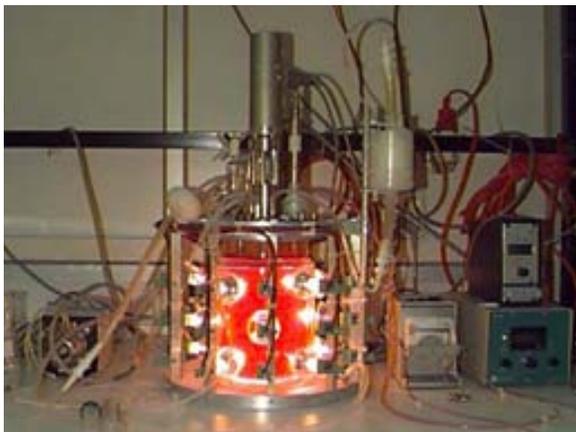


Figura 3.1: Fotobiorreactor *Applikon*, de 2.4 L de volumen útil.

Agitación

Este fotobiorreactor está provisto de agitación mecánica, siendo el impulsor una turbina *Rushton*. La velocidad de agitación ha sido constante en todos los experimentos e igual a 300 rpm, siendo ésta un buen compromiso entre una correcta homogeneización sin llegar a producir la lisis de las células.

Refrigeración

La cuba del fotobiorreactor está rodeada de una doble camisa, también de vidrio, la cual ofrece una sección interna de paso de 1 cm de anchura y permite la circulación de agua termostatzada por su interior.

Iluminación

- Número y tipo de lámparas

Se han utilizado dos configuraciones distintas de lámparas en este fotobiorreactor, con un total de 15 y 30 lámparas halógenas (Silvana professional, BAB 38°, 12 V, 20W, versión mejorada, haz frío, con filtro de ultravioletas y código tipo 215) cada una.

- Distribución de las lámparas

Las lámparas están distribuidas alrededor de la cuba de vidrio del fotobiorreactor, formando tres filas a diferente altura. En la configuración de 15 lámparas totales, hay 5 lámparas en cada una de las filas y en la configuración de 30 lámparas totales, 10 lámparas por fila. Las lámparas están situadas a 15 mm de distancia de la cuba del fotobiorreactor, tal y como se puede apreciar en el esquema de la figura 3.2.

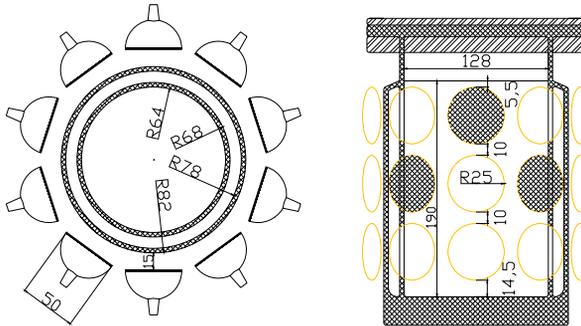


Figura 3.2: Distribución física de las lámparas halógenas en relación a la cuba de vidrio del fotobiorreactor.

- Potencia de iluminación

El hecho de disponer de 30 lámparas de 20 W hace que el fotobiorreactor disponga de una potencia máxima de iluminación de 600 W. Si se calcula la relación entre la potencia y el volumen, surge un valor de 250 W/L de volumen útil.

- Irradiancia incidente máxima

La irradiancia incidente máxima que se puede obtener en este montaje experimental, correspondiente a cuando se suministran 12 V a las lámparas, está entorno a $7.500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para el montaje de 15 lámparas y de $13.000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aproximadamente para el montaje de 30 lámparas (figura 3.18).

- Fracción de volumen iluminado

La fracción de volumen iluminado es de 1.0, puesto que la totalidad del volumen útil está expuesto a la radiación.

3.2.2. Fotobiorreactor escala piloto

Descripción general

El fotobiorreactor de escala piloto utilizado en los experimentos es un fotobiorreactor *Bioengineering* (Wald, Suiza), el cual dispone de dos partes. Una es de vidrio y

permite la irradiación del cultivo y la otra, el cabezal, es de acero inoxidable y permite la localización de las sondas. La geometría del fotobiorreactor es cilíndrica, con una capacidad total de 8 L, de los cuales 3.8 L corresponden al volumen útil. En la tabla 3.5 se resumen las principales características físicas de la cuba y en la figura 3.3 se puede apreciar el fotobiorreactor así como el resto de equipos auxiliares.

Características físicas de la cuba	
Diámetro	0.096 m
Altura	0.52 m
Superficie	0.157 m ²
Volumen útil	3.76 L
Relación Volumen/Superficie	41.67 m ² /m ³

Tabla 3.5: Características físicas de la cuba del fotobiorreactor Bioengineering.



Figura 3.3: Fotobiorreactor Bioengineering, de 8 L de volumen útil.

Agitación

Este fotobiorreactor dispone de un sistema de agitación mecánica, con impulsores a cinco niveles, todos ellos con la geometría del esquema de la figura 3.4. La velocidad de agitación ha sido de 300 rpm en todos los experimentos, siendo ésta un buen compromiso entre una correcta homogeneización sin llegar a producir la lisis de las células.

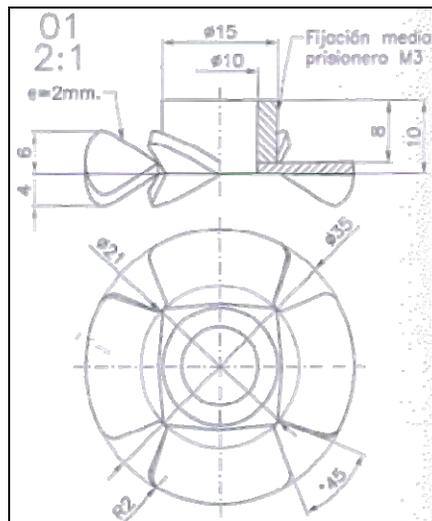


Figura 3.4: Geometría de los impulsores del sistema de agitación mecánica del fotobiorreactor piloto.

Refrigeración

La cuba del fotobiorreactor está rodeada de una doble camisa, también de vidrio, la cual ofrece una sección interna de paso de 1 cm de anchura y permite la circulación de agua termostatzada por su interior.

Iluminación

- Número y tipo de lámparas

El fotobiorreactor está iluminado mediante un conjunto de 48 lámparas halógenas (Silvana professional, BAB 38°, 12 V, 20W, versión mejorada, haz frío, con filtro de ultravioletas y código tipo 215).

- Distribución de las lámparas

Las lámparas están distribuidas alrededor de la cuba de vidrio del fotobiorreactor, formando seis columnas verticales, cada una de 8 lámparas. Las lámparas están situadas a 20 mm de distancia de la cuba del fotobiorreactor.

- Potencia de iluminación

El hecho de disponer de 48 lámparas de 20 W hace que el fotobiorreactor disponga de una potencia total de iluminación de 960 W. Si se calcula la relación entre la potencia y el volumen, surge un valor de 255 W/L de volumen útil y de 120 W/L si se tiene en cuenta el volumen total del fotobiorreactor.

- Irradiancia incidente máxima

La irradiancia incidente máxima que se puede obtener en este montaje experimental, correspondiente a cuando se suministran 12 V a las lámparas, está entorno a $4.500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura 3.18).

- Fracción de volumen iluminado

La fracción de volumen iluminado es del 47.0 %, puesto que el volumen del interior del cabezal de acero inoxidable es un volumen oscuro en el que no hay crecimiento, comportándose así como un volumen muerto.

3.3. Procedimientos analíticos

3.3.1. Determinación de la concentración de células

En los experimentos en discontinuo en las botellas *Roux*, debido al pequeño volumen disponible de las muestras, la concentración de células ha sido determinada mediante la medida de la absorbancia a 700 nm (KONTRON INSTRUMENTS, UVIKON 941 Plus, Milán, Italia) y una correlación entre el peso seco de las células y la absorbancia. Esta correlación se ha determinado para cada uno de los ensayos llevados a cabo en las botellas, y en la figura 3.5 se muestra a modo de ejemplo la calibración correspondiente al experimento número 1.

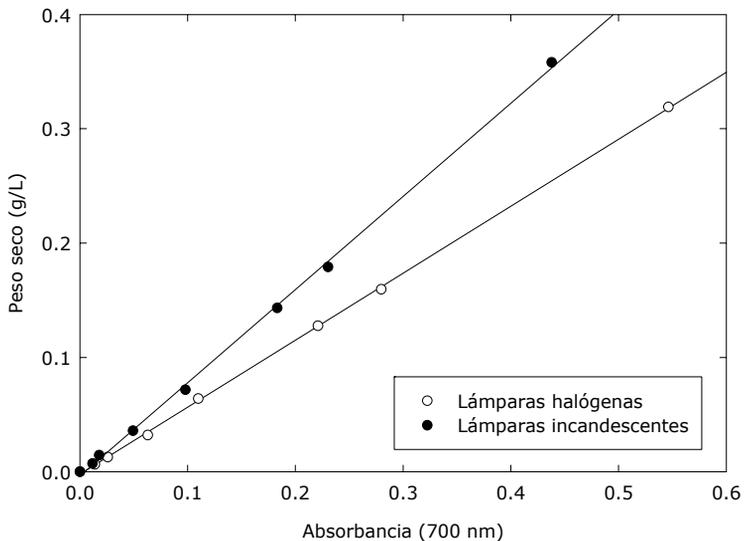


Figura 3.5: Correlación entre el peso seco de células y la absorbancia a 700 nm para el ensayo número 1 llevado a cabo en las botellas *Roux*.

Para este experimento, la relación entre la absorbancia y el peso seco sería:

- L. halógenas: $\text{Peso seco (g/L)} = -2.13 \cdot 10^{-3} + 0.59 \cdot \text{Abs (700 nm)}$ ($r^2=0.9997$)
- L. incand.: $\text{Peso seco (g/L)} = -3.66 \cdot 10^{-3} + 0.82 \cdot \text{Abs (700 nm)}$ ($r^2=0.9990$)

En todos los experimentos llevados a cabo en los fotobiorreactores, la concentración de células ha sido seguida mediante el peso seco. Para determinar el peso seco, se filtra la muestra con un filtro 0.22 μm de Millipore, se pone a secar hasta que tenga un peso constante mediante un microondas (20 minutos, 150 W) y enfriada hasta temperatura ambiente en un desecador de sílica gel. El valor de peso seco se calcula como la media aritmética de tres muestras.

3.3.2. Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de fuente de carbono ha sido analizada en todos los casos mediante cromatografía de gases. Este método permite el análisis de ácidos grasos saturados e insaturados de dos a cinco átomos de carbono, correspondientes al ácido acético, al ácido propiónico, al ácido isobutírico, al ácido butírico, al ácido isovalérico y al ácido valérico (ordenados por tiempo de retención creciente).

El rango de concentraciones que puede ser determinado es de 0.0625 g/L hasta 4.0000 g/L. El volumen de muestra es 50 μL . Las muestras han sido analizadas por triplicado y el valor utilizado es la media aritmética.

Instrumentación

- Cromatógrafo líquido Hewlett Packard 5890, equipado con una columna de capilaridad e inyector automático.
- Detector FID
- Software de integración Millenium 3.20

Condiciones físicas del análisis

- Columna: HP-InnoWax 30 m x 0.53 mm x 1.00 μm
- Gas portador: helio
- Caudal: 49.0 mL/min
- Volumen de inyección: 1 μL
- Tiempo de análisis: 19 minutos
- Temperatura de inyección: 260 °C
- Temperatura del detector: 280 °C

- Temperatura del horno: inicio 1 minuto 80 °C, rampa 5 °C/min hasta 150 °C, rampa 20 °C/min. hasta 260 °C

Preparación de la muestra

- Centrifugar (12000 g, 10 minutos, 8 °C)
- Filtrar con una membrana de 0.22 μm

Calibración

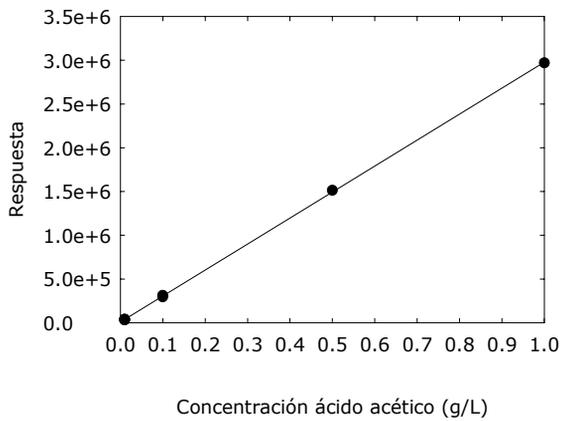


Figura 3.6: Patrón de calibración de la concentración de ácido acético en el cromatógrafo de gases.

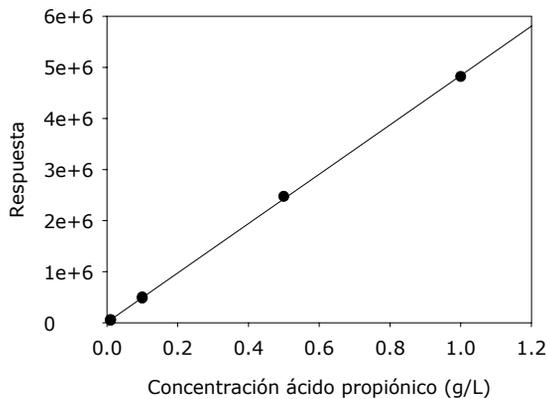


Figura 3.7: Patrón de calibración de la concentración de ácido propiónico en el cromatógrafo de gases.

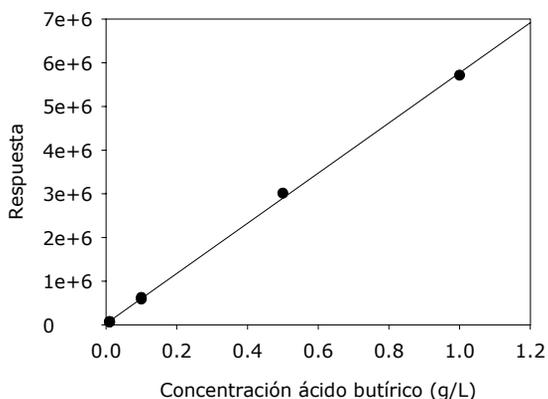


Figura 3.8: Patrón de calibración de la concentración de ácido butírico en el cromatógrafo de gases.

3.3.3. Determinación del contenido total de carbohidratos

Reactivos

1. Ácido sulfúrico concentrado (96-97%)
2. Fenol 5% (p/v)
3. Glucosa

Tratamiento de la muestra

- Centrifugar (14000 rpm, 20 minutos, 4 °C) 10 mL de la muestra de cultivo. Despreciar el sobrenadante.
- Resuspender en agua destilada.
- Centrifugar en las mismas condiciones. Despreciar el sobrenadante.
- Resuspender en agua destilada.

Alternativamente, disolver una muestra de biomasa liofilizada en agua destilada.

Análisis

- Añadir a 1 mL de muestra:

- 1 mL de fenol y mezclar lentamente
 - 5 mL de ácido sulfúrico y mezclar lentamente
- Esperar 10 minutos
 - Enfriar los tubos (15 minutos en agua a 25 °C)
 - Medir la absorbancia de las muestras a 488 nm. Tomar como blanco agua destilada.

Resultados

- Preparar un patrón de calibración utilizando muestras de glucosa en el rango de concentraciones 0-100 mg/L.
- Calcular la concentración de 1 mL de muestra interpolando la absorbancia medida en el patrón de calibración.

Recta ajustada: [glucosa] (mg/L) = -3.30 + 103.57 · Abs (488 nm) $r^2=0.997$

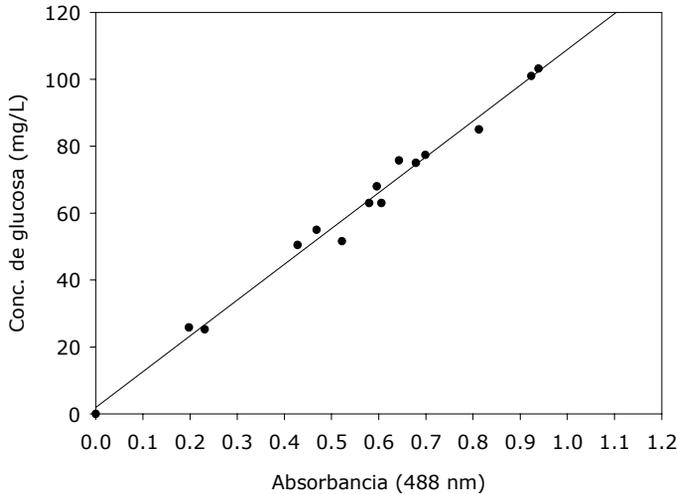


Figura 3.9: Recta patrón de calibración de la concentración de carbohidratos, expresados en mg glucosa/L.

3.3.4. Determinación del contenido de lípidos

La determinación del contenido de lípidos de las muestras de biomasa se han llevado a cabo, después de un proceso de extracción, mediante cromatografía de gases con un FID y un espectrómetro de masas como detectores. Los análisis han sido realizados por el servicio de análisis *Serveis Científicotècnics* de la *Universitat de Barcelona*.

3.3.5. Determinación del contenido de proteínas en la biomasa

El contenido de proteínas de la biomasa se ha determinado utilizando el método modificado de Lowry, el cual se describe a continuación.

Reactivos

1. Reactivo A. Disolver 20 g de Na_2CO_3 en 1000 mL de agua destilada.
2. Reactivo B. Disolver 0.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 1 g de Na-K tartrato en 1000 mL de agua destilada.
3. Reactivo C. Mezclar 50 mL del reactivo A y 1 mL del reactivo B. (Este reactivo no se puede conservar).
4. Reactivo D. Reactivo de Folin-Ciocalteus, diluido 1:2 (v/v) en agua destilada.
5. Solución patrón de albúmina en el rango 40-400 μg prot./mL
6. Solución de biomasa liofilizada 500 μg /mL (0.0025 g biomasa/5 mL agua destilada).
7. NaOH 1 M

Procedimiento

- Preparar la siguientes soluciones patrón de albúmina:

400 µg/mL	0.04 g en 100 mL de agua destilada
320 µg/mL	20 mL solución de 400 µg/mL en 25 mL
200 µg/mL	10 mL solución de 400 µg/mL en 20 mL
160 µg/mL	10 mL solución de 400 µg/mL en 25 mL
100 µg/mL	5 mL solución de 400 µg/mL en 20 mL
80 µg/mL	5 mL solución de 400 µg/mL en 25 mL
40 µg/mL	2 mL solución de 400 µg/mL en 20 mL

- Preparar las soluciones de biomasa.
- Tomar 0.5 mL de cada solución patrón, 0.5 mL de cada solución de biomasa y 0.5 mL de agua destilada, todo por triplicado. Preparar el blanco con 0.5 mL de cada solución patrón y 1 mL de agua destilada.
- Añadir 0.5 mL de NaOH 1 M a cada muestra
- Hervir a 100 °C durante 10 minutos cada muestra. Enfriar en un baño de agua.
- Añadir 5 mL de reactivo C a cada muestra. Agitar y esperar 10 minutos.
- Añadir 0.5 mL de reactivo D a cada muestra. Mezclar y guardarlo a oscuras durante 30 minutos.
- Medir la absorbancia a 750 nm e interpolar en la siguiente curva.

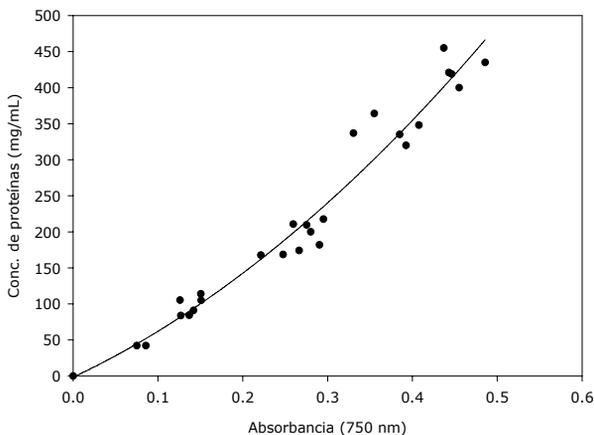


Figura 3.10: Patrón de calibración de la concentración de proteínas. $[Prot.] = -1.7169 + 551.9234 \cdot Abs(750\text{ nm}) + 847.5002 \cdot Abs(750\text{ nm})^2$; $r^2 = 0.98$.

3.3.6. Determinación del contenido de DNA

Reactivos

1. Reactivo A. Disolver 15 g de difenilamina y 15 mL H₂SO₄ concentrado en 1 L de CH₃COOH.
2. Reactivo B. 2 L de HClO₄ 0.2 N
3. Reactivo C. 1 L de HClO₄ 0.5 N
4. Reactivo D. Mezclar 1 L de cloroformo y 500 mL de metanol.

Procedimiento

- Añadir 25 g de biomasa liofilizada en 10 mL de reactivo B. Mantenerlo 15 minutos a 4 °C. Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm. Despreciar el sobrenadante.
- Repetir el primer paso.
- Añadir al pélet 10 mL de reactivo D. Esperar 5 minutos y centrifugar 5 minutos a 6000 rpm. Despreciar el sobrenadante.
- Repetir el tercer paso.
- Añadir al pélet 5 mL de reactivo C. Mantenerlo a 70 °C durante 45 minutos. Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm.
- Tomar tres muestras del sobrenadante (0.5 mL, 1 mL y 1.5 mL) y preparar 5 soluciones patrón de sal de DNA-Na (0.1 g, 0.2 g, 0.3 g, 0.4 g y 0.5 g). Añadir a todas las muestras reactivo C hasta tener 2 mL totales. Añadir 4 mL de reactivo D y mantener a 30 °C durante 16-24 h.
- Medir la absorbancia a 600 nm e interpolar en la siguiente recta patrón:
Contenido DNA (mg) = -0.0219 + 0.5138 · Abs (600 nm) r² = 0.998

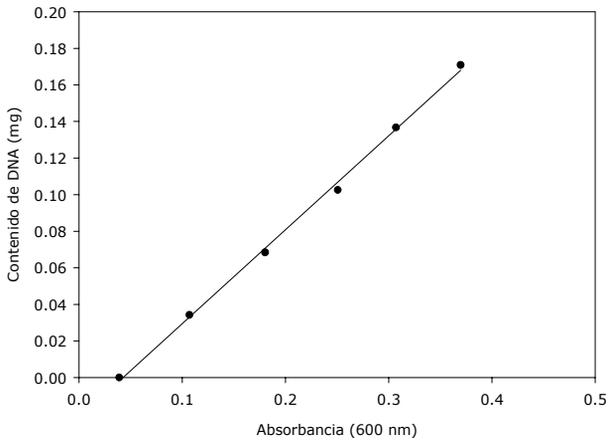


Figura 3.11: Recta patrón de calibración del contenido de DNA, en mg.

3.3.7. Determinación del contenido de RNA

Reactivos

1. Reactivo A. HClO_4 0.2 N
2. Reactivo B. Disolver 2.5 g de orcinol en 5 mL de etanol (95%)
3. Reactivo C. Solución estándar de RNA. Concentración: 100 mg/mL (almacenado a 4 °C).
4. Reactivo D. Disolver 0.3 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ en 200 mL de HCl concentrado (preparado el mismo día del análisis)
5. Reactivo E. Mezclar 2 mL de reactivo A con 100 mL de reactivo C.
6. Reactivo F. KOH 0.3 N
7. Reactivo G. Mezclar 1 L de cloroformo y 500 mL de metanol.

Procedimiento

- Añadir a 25 g de biomasa liofilizada 10 mL de reactivo A. Mantener 15 minutos a 4 °C. Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm. Despreciar el sobrenadante.
- Repetir el primer paso.

- Añadir al pélet 10 mL de reactivo G. Esperar 5 minutos y centrifugar 5 minutos a 6000 rpm. Despreciar el sobrenadante.
- Repetir el tercer paso.
- Añadir al pélet 2 mL de reactivo F. Mantener a 30 °C durante 18-24 horas.
- Enfriar y añadir HClO₄ concentrado hasta alcanzar pH=1.
- Centrifugar 6 minutos a 6000 rpm. Reservar el sobrenadante.
- Lavar el pélet con 1 mL de reactivo A. Centrifugar 6 minutos a 6000 rpm. Reservar el sobrenadante.
- Mezclar los dos sobrenadantes y tomar tres muestras (0.1 mL, 0.2 mL y 0.3 mL). Tomar seis muestras de solución estándar de RNA (2 mg RNA estándar en 20 mL de cloroformo) - 0.2 mL, 0.4 mL, 0.8 mL, 1 mL, 1.5 mL y 2 mL -. Añadir agua destilada hasta alcanzar 2 mL de volumen total y añadir 2 mL de reactivo G.
- Mantener durante 35 minutos a 100 °C. Enfriar en un baño termostático a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 665 nm e interpolar en la siguiente recta patrón:
Contenido RNA (mg)=-0.0087 + 0.1849 · Abs (665 nm) $r^2=0.9995$

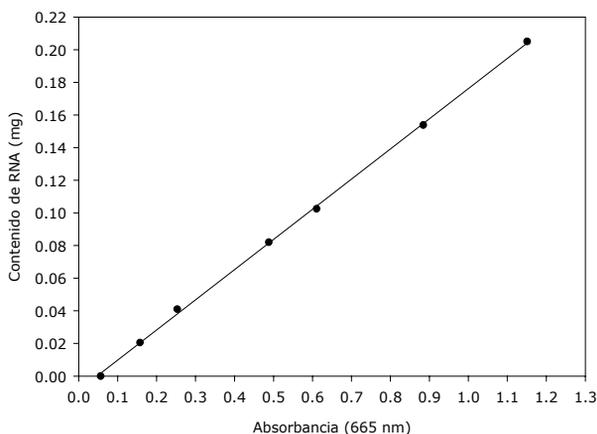


Figura 3.12: Recta patrón de calibración del contenido de RNA, en mg.

3.3.8. Determinación del contenido de poli- β -hidroxialcanoatos (PHAs)

Reactivos

1. Reactivo A. Metanol acidificado (100.00 mg ácido benzoico, 30 mL de H₂SO₄ (98%) y enrasado hasta 1 L con metanol 99.8%).
2. Reactivo B. Cloroformo.
3. Reactivo C. Copolímero de ácido 3-hidroxibutírico y ácido 3-hidroxicaproyico (70:30), suministrado por Fluka.

Procedimiento

- Añadir a 40 mg de biomasa liofilizada 4 mL del reactivo A y 4 mL del reactivo B.
- Mantener durante 3.5 horas a 100 °C. Centrifugar 5 minutos a 6000 rpm.
- Añadir 1 mL de agua destilada y agitar durante 5 minutos.
- Extraer el cloroformo (la fase pesada, 3.5 mL). Despreciar la fase ligera.
- Centrifugar a 3000 g durante 5 minutos.
- Filtrar utilizando una membrana de 0.45 μ m (utilizar filtros para solventes orgánicos).
- Realizar la determinación por cromatografía de gases.

Instrumentación

- Cromatógrafo líquido Hewlett Packard 5890, equipado con una columna de capilaridad e un inyector automático.
- Detector FID
- Software de integración Millennium 3.20

Condiciones físicas del análisis

- Columna: HP-InnoWax 30 m x 0.53 mm x 1.00 μ m
- Gas portador: helio
- Caudal: 54.0 mL/min
- Volumen de inyección: 1 μ L, dividido 1:2

- Tiempo de análisis: 13 minutos
- Temperatura de inyección: 220 °C
- Temperatura del detector: 275 °C
- Temperatura del horno: inicio 2 minuto 70 °C, rampa 10 °C/min hasta 160 °C, 2 minutos 160 °C, rampa 20 °C/min. hasta 220 °C.

3.3.9. Determinación del contenido de glicógeno

Reactivos

1. HCl 0.6 M

Procedimiento

- Tomar 20 mg de biomasa liofilizada
- Añadir 10 mL de HCl 0.6 M
- Mantener en un baño de agua hirviendo durante 1 hora. Enfriar.
- Filtrar utilizando una membrana de 0.45 μm .
- Medir la concentración de glucosa con un analizador automático de glucosa (YSI 2700 Select-Yellow Spring Inst.).

3.3.10. Determinación de la composición elemental de la biomasa

La determinación de la composición de C, N, H y S se ha llevado a cabo mediante la combustión de la muestra en una cápsula de Sn en una atmósfera de O₂ en un horno a 100 °C. El P ha sido determinado mediante ICP. Los análisis han sido realizados por el *Servei d'Anàlisi Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

A. Método de combustión

La combustión transforma los componentes orgánicos de la muestra en los correspondientes óxidos, obteniendo una mezcla de CO₂, N₂, N_xO_y, H₂O, SO₂ y SO₃. La reacción exotérmica, la cual convierte en Sn en SnO₂(s), desprende calor que

incrementa la temperatura de la cápsula hasta 1800 °C. SnO₂ se haya al final como un sólido en la cámara de combustión. Los componentes inorgánicos de la muestra también se hayan en forma de óxidos en la cámara de combustión.

Los gases formados, así como el exceso de O₂, fluyen con helio como gas portador hacia un reactor con WO₃, el cual produce la transformación de la mezcla de gases en especies únicas para cada elemento, obteniendo CO₂, N₂, H₂O, SO₂ y el O₂ y el He en exceso. Esta mezcla se conduce a un reactor que se encuentra 500 °C y que contiene CuO, el cual reacciona con el O₂ en exceso para dar CuO(s).

Los gases restantes CO₂, N₂, H₂O y SO₂ son conducidos junto al helio a un cromatógrafo de gases (Porapak column, Waters Associates Inc.), donde son separados y cuantificados utilizando un detector de conductividad térmica, el cual produce una señal proporcional a la cantidad del componente.

La preparación de la muestra consiste en liofilizar la biomasa.

La cuantificación se realiza mediante interpolación en una curva de referencia apropiada.

B. Análisis ICP

La muestra (0.1 g) es digerida con 2 mL de HNO₃ y 2 mL de H₂O₂ en un reactor estanco a 90 °C durante una noche. La muestra digerida es diluida con 15 mL de agua destilada de calidad 'Milli-Q'. Las muestras son digeridas por triplicado y se añaden cuatro muestras blanco.

La determinación ICP se realiza mediante un espectrofotómetro de plasma de inducción 'Perkin Elmer' Optima 3200 RL. La calibración se lleva a cabo utilizando muestras de referencia de P, digeridas con HNO₃ 5%.

3.4. Calibraciones

3.4.1. Irradiancia incidente

Botellas

Durante la fotosíntesis, las plantas y algunos microorganismos de color verde utilizan la energía de la región del espectro electromagnético comprendida entre 400 y 700 nm. Al ser este rango de longitudes de onda el más común, los aparatos de medida suelen utilizar sólo este intervalo. La radiación de este rango, comúnmente conocida como radiación activa fotosintéticamente (PAR), se suele medir como una densidad de flujo de fotones (PPFD), que tiene unidades de fotones por unidad de tiempo y unidad de área.

En los experimentos realizados en las botellas, la irradiancia incidente se ha medido mediante un sensor plano (Licor LI-190SA) conectado a un amplificador LI-250, proporcionando las lecturas en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en el rango 400-700 nm (figura 3.13).



Figura 3.13: Sensor de luz plano Licor LI-190SA.

Para conocer la cantidad de fotones emitida en el rango 350-950 nm a partir de la lectura del sensor en el rango 400-700 nm, hay que tener en cuenta la relación de áreas de estos dos intervalos en la curva de distribución del espectro de emisión, para diferentes voltajes (figura 4.1). Realizando este cálculo, se ha encontrado que para calcular la irradiancia incidente en el rango 350-950 nm se debe multiplicar el valor de la irradiancia incidente en el rango 400-700 nm por los coeficientes 2.5 y 4.5 para las lámparas halógenas e incandescentes, respectivamente.

Para determinar la irradiancia incidente media en la superficie de las botellas, se ha situado una lámina de cristal cuadrículada justo en la posición donde estaría situada la cara de la botella expuesta a la luz. Se ha medido la irradiancia incidente en cada uno de los puntos de la cuadrícula, los cuales tienen una separación de 1 cm, en los dos montajes experimentales.

Para fijar la irradiancia incidente en un valor deseado, se mide la irradiancia en cada punto de la cuadrícula y se calcula el valor medio del flujo de energía que llega a la

lámina, que es el mismo que llegaría a la superficie de la botella. Se calcula el valor medio de todas las lecturas y se compara con el valor deseado. Si no concuerda con éste, hay que variar el voltaje aplicado a las lámparas, o bien la distancia entre las lámparas y la botella.

Los valores medidos en cada punto de la cuadrícula se detallan a continuación y se encuentran representados en la figura 3.14 para las lámparas halógenas y en la figura 3.15 para las lámparas incandescentes.

Altura de la botella (cm)	Anchura de la botella (cm)										
	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
10	22	23	24	23	24	23	22	21	20	19	18
9	24	25	25	25	26	26	25	25	24	23	22
8	25	26	27	27	28	28	28	28	28	28	25
7	26	29	29	29	29	30	30	30	30	30	29
6	29	31	31	31	32	32	32	32	32	32	31
5	31	33	33	33	33	33	32	33	34	34	33
4	32	35	36	37	37	36	37	36	36	36	36
3	35	37	39	40	40	40	41	41	41	41	41
2	37	41	43	44	45	46	45	45	44	44	43
1	40	44	48	49	50	51	51	51	49	48	47
0	49	50	52	54	56	57	57	56	54	53	50
-3	32	35	40	40	40	40	45	57	55	52	50
-4	30	35	38	40	43	46	49	49	49	47	41
-5	39	42	46	49	48	52	55	59	56	54	49
-6	37	40	43	46	49	52	54	55	52	46	45
-7	34	36	37	39	41	44	49	51	49	46	41
-8	30	32	34	35	37	40	44	43	40	36	32
-9	30	33	34	35	36	38	40	38	36	33	30

Tabla 3.6: Valores de irradiancia incidente, expresados en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ emitidos en el rango 400-700 nm, tomados en la calibración de la irradiancia incidente en el montaje experimental de las lámparas halógenas. Valores representados en la figura 3.14.

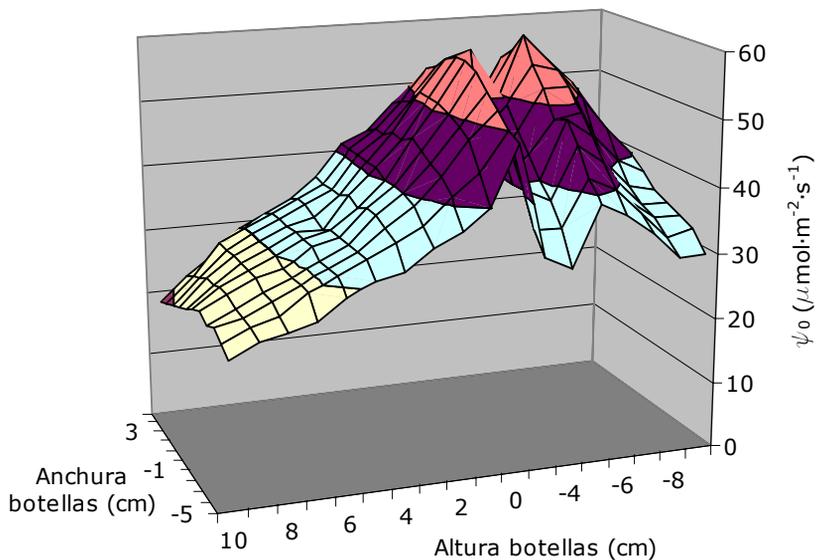


Figura 3.14: Distribución de la irradiancia incidente en la superficie de la botella. Montaje experimental correspondiente a las lámparas halógenas.

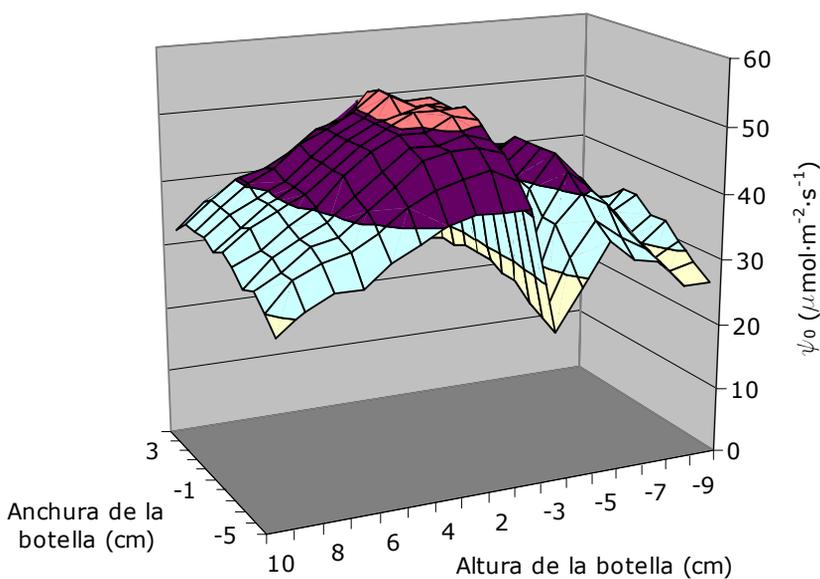


Figura 3.15: Distribución de la irradiancia incidente en la superficie de la botella. Montaje experimental correspondiente a las lámparas incandescentes.

Altura de la botella (cm)	Anchura de la botella (cm)										
	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
10	27	29	31	30	32	33	32	33	33	33	31
9	30	33	33	34	34	36	35	36	36	36	35
8	32	35	36	36	37	38	38	38	39	39	37
7	32	36	37	38	39	40	40	40	41	40	38
6	35	38	40	41	43	43	43	43	44	42	40
5	37	41	43	44	46	46	46	46	46	45	43
4	39	43	46	47	48	48	48	48	48	46	45
3	40	44	47	47	48	50	49	51	51	50	47
2	40	45	47	48	50	50	50	49	49	48	45
1	40	43	46	47	49	50	49	49	49	47	45
-3	22	23	24	26	26	27	27	27	26	26	25
-4	28	31	35	35	38	39	40	40	39	39	36
-5	34	36	39	41	43	43	43	43	41	40	39
-6	31	33	37	38	39	40	40	40	38	37	35
-7	30	31	32	34	34	35	36	36	35	33	31
-8	26	27	28	29	29	32	30	32	32	30	29
-9	26	28	30	32	32	34	34	32	31	30	29

Tabla 3.7: Valores de irradiancia incidente, expresados en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ emitidos en el rango 400-700 nm, tomados en la calibración de la irradiancia incidente en el montaje experimental de las lámparas halógenas. Valores representados en la figura 3.15.

Fotobiorreactores

Cuando se procede a determinar la irradiancia incidente en el interior de un reactor con geometría cilíndrica, no se puede medir la radiación incidente teniendo en cuenta sólo una dimensión. Es necesario medir la luz que llega de todas las direcciones e integrarla. Así pues, en los fotobiorreactores se ha utilizado un sensor de luz esférico (LI-193SA), conectado a un amplificador LI-250, el cual mide la radiación que le llega en todas las direcciones del espacio (figura 3.16).



Figura 3.16: Sensor esférico utilizado en la calibración de la irradiancia incidente en los fotobiorreactores.

En el caso de los fotobiorreactores, en los cuales se desea variar relativamente a menudo la irradiancia incidente suministrada, interesa disponer de un calibrado que relacione el voltaje aplicado a las lámparas con la irradiancia incidente media que llegaría al centro del reactor. Por tanto, se ha medido la irradiancia incidente en el centro del fotobiorreactor, para diferentes voltajes y para diferentes alturas, con la finalidad de calcular posteriormente un valor

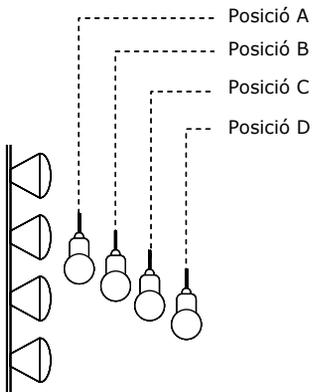


Figura 3.17: Posiciones del sensor relativas a la disposición de las lámparas

medio respecto a la altura del reactor. Las alturas seleccionadas para realizar las medidas de irradiancia incidente deben de ser representativas de la distribución de la radiación en el sentido axial del reactor. Por este motivo, se han escogido cuatro posiciones (A, B, C y D) que situadas respecto a una lámpara determinada permiten cubrir todo el haz de influencia de la lámpara, y por tanto, el valor medio será representativo de la luz emitida (figura 3.17). Así pues, la media de las lecturas del sensor en estas cuatro posiciones constituirá una buena media de la irradiancia incidente en el sentido axial del reactor.

Tanto en el caso del fotobiorreactor de escala laboratorio como en el caso del fotobiorreactor piloto, se ha relacionado el voltaje aplicado a las lámparas con la irradiancia incidente medida por el sensor cuando el fotobiorreactor está vacío.

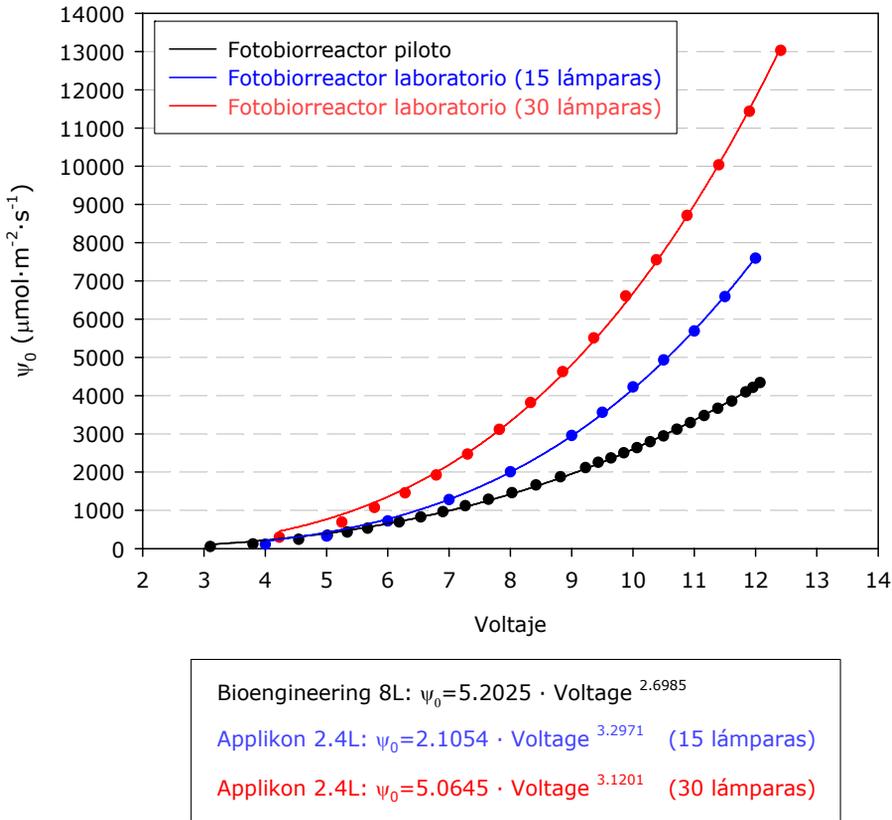


Figura 3.18: Curvas de calibración de la irradiancia incidente en los dos fotobiorreactores utilizados. En el fotobiorreactor de escala piloto, se distingue entre la configuración de 15 lámparas y la de 30 lámparas.

3.4.2. Concentración de azul dextrano

Para convertir los valores de absorbancia en concentración de azul de dextrano se ha llevado a cabo una recta de calibración de 20 puntos. En la figura 3.19 se ha representado la relación entre la absorbancia a 618 nm y la concentración de azul de dextrano, expresada en g/L.

La recta de regresión resultante es:

$$C \text{ (g/L)} = -0.0112 + 1.0417 \cdot \text{Absorbancia (618 nm)} \quad (r^2 = 0.9996)$$

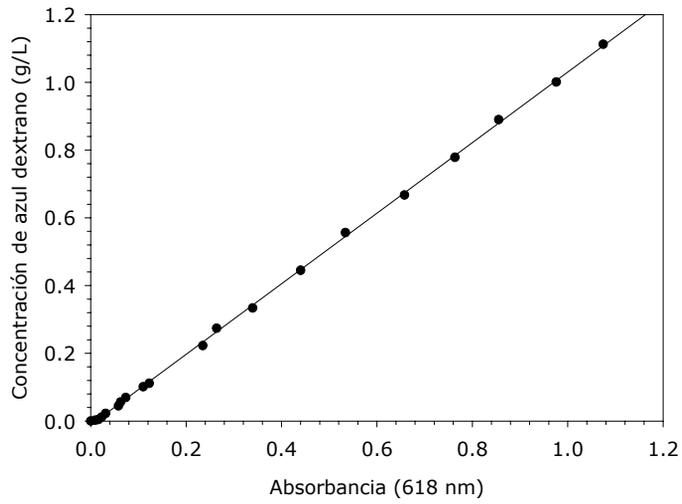


Figura 3.19: Recta de calibración de la concentración de azul dextrano (g/L) respecto a la absorbancia a 618 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*4.1. Estudio de la influencia de la naturaleza de la fuente de luz en el crecimiento de *R. rubrum**

4.1.1. Introducción

En el crecimiento de microorganismos fotosintéticos la naturaleza de la luz, concretamente su espectro de absorción, desarrolla un papel muy importante. Se han llevado a cabo diferentes experimentos, en discontinuo y con iluminación monodimensional, con el objetivo de estudiar la influencia de la naturaleza de la radiación suministrada sobre la cepa de *R. rubrum*, utilizando dos tipos diferentes de lámparas: halógenas e incandescentes. Las primeras han sido consideradas como referencia porque son las utilizadas en todos los trabajos previos del proyecto

MELISSA. Por otro lado, las lámparas incandescentes son el sujeto de este estudio, dado que su espectro de emisión de luz presenta valores máximos a unas longitudes de onda muy cercanas a la de los picos de absorción de las clorofilas del centro de reacción de las bacterias fotosintéticas.

Con la finalidad de conocer las características de la luz emitida por los dos tipos de lámparas utilizados en estos experimentos, se midieron sus espectros de emisión (figura 4.1) en los laboratorios de ESTEC XAL (Noordwijk, Holanda).

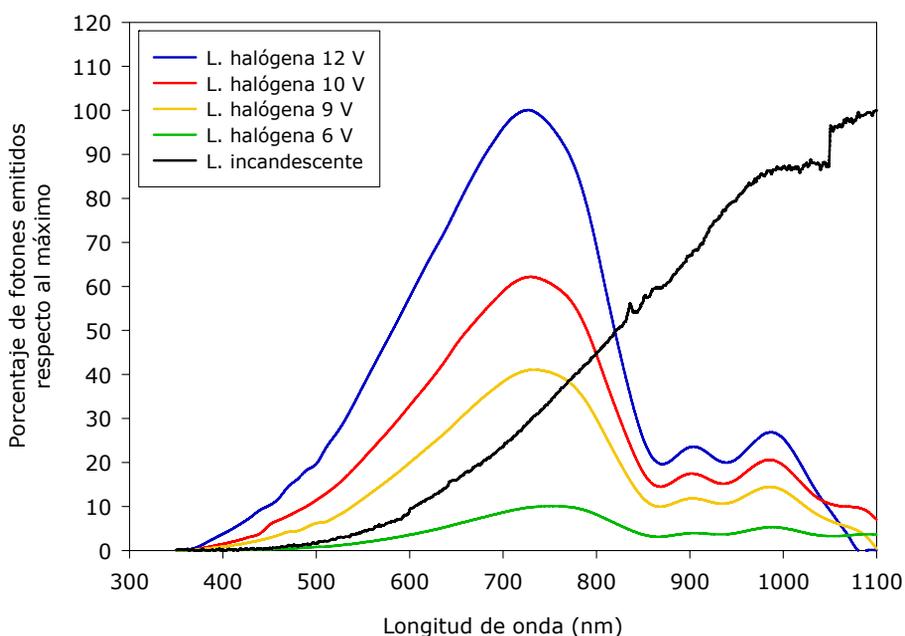


Figura 4.1: Espectros normalizados de emisión de los dos tipos de lámparas utilizadas, incandescentes (15 W, 220 V) y halógenas (20 W, 12V).

Observando la figura 4.1, se puede apreciar que el máximo de emisión de radiación en el caso de las lámparas halógenas se encuentra situado sobre 720-740 nm, mientras que en el caso de las incandescentes éste se alcanza a 960 nm.

Por otro lado, hay que tener presente que *R. rubrum* no tiene máximos de absorción de luz a 720-740 nm, sino que contiene carotenoides que absorben a longitudes de

onda más bajas (el máximo se encuentra sobre 520 nm) y clorofilas que absorben en el rango 800-950 nm (picos a 800 y 880 nm) (Kohen *et al.*, 1995; Madigan, 1988).

La luz recogida a 520 nm, a nivel de membrana, es finalmente transferida hasta el centro de reacción, el cual tiene el máximo de absorción a 880 nm. Como consecuencia de este flujo de energía, parte de la energía recogida a 520 nm se pierde en forma de calor, en una cantidad que, como mínimo, es del mismo orden que la diferencia del contenido energético entre los fotones de la luz recogida a 520 nm y los de la luz absorbida a 880 nm (Goedheer, 1959). Así pues, la energía de la cual las células pueden disponer es sin duda inferior a la energía de los fotones absorbidos y, por tanto, la luz absorbida a 880 nm es utilizada de forma más eficiente que la luz absorbida a longitudes de onda más bajas. Existen experimentos previos donde se han observado diferentes velocidades específicas de crecimiento en función de la luz monocromática suministrada al cultivo (Göbel, 1978b). Por ejemplo, teniendo en cuenta el mismo número de fotones, los de 860 nm hacen que las células crezcan a una velocidad específica más elevada que los de 522 nm. No obstante, una lámpara no emite luz monocromática y, además, genera calor.

Por otro lado, si se tiene en cuenta que el sensor de luz utilizado realiza las lecturas en el intervalo del espectro entre 400 y 700 nm y que las células de *R. rubrum* tiene capacidad de captar fotones de longitud de onda mayor de 700 nm, se plantea la necesidad de determinar si las células aprovechan eficientemente la luz captada por encima de los 700 nm.

Además, desde el punto de vista práctico y teniendo en cuenta que el espectro de emisión de los dos tipos de lámparas es muy diferente, es importante evaluar qué lámpara es más adecuada para el cultivo de *R. rubrum* y, en términos de energía, cuál es más eficaz.

4.1.2. Equipo experimental

Los experimentos se han llevado a cabo en el sistema experimental que se muestra en la figura 4.2 y en la figura 4.3. Éste consiste en una cámara oscura, con las superficies internas recubiertas de color negro, donde se ha instalado, en cada uno de los dos estantes de los que dispone, dos montajes análogos en los que la iluminación es monodimensional. Así pues, en cada experimento es posible medir la velocidad

específica de crecimiento de las células para los dos tipos de lámparas, en las mismas condiciones de operación y de forma simultánea.

En el montaje del estante inferior se han instalado 9 lámparas incandescentes (Philips Practitone, 220V, 15W) y están situadas a una distancia de 130 mm de la superficie de la botella *Roux* donde se desarrolla el cultivo. Por el contrario, en el estante superior de la cámara oscura, se han instalado 8 lámparas halógenas (Silvana professional BAB 38° 12V 20W, versión mejorada, con filtro de ultravioleta, código tipo 215) a una distancia de 280 mm de la superficie de la botella.

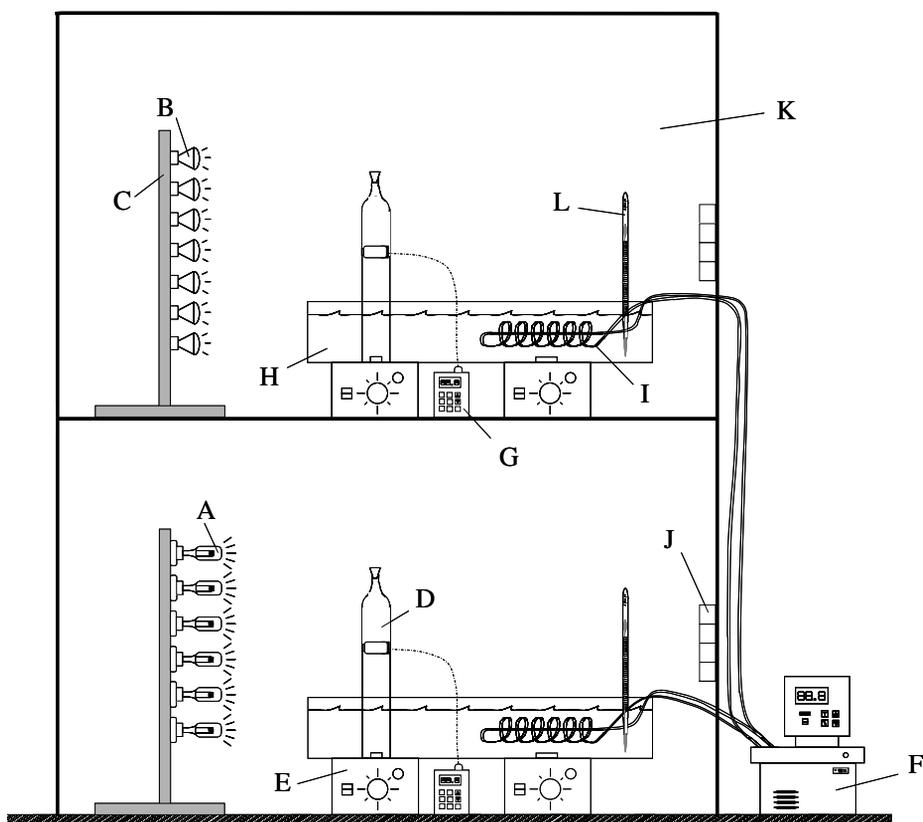


Figura 4.2: Esquema del montaje experimental utilizado. A: Lámparas incandescentes; B: Lámparas halógenas; C: Soporte para lámparas; D: Botellas Roux; E: Agitador magnético; F: Baño termostático; G: Sensor de luz; H: Baño de agua; I: Serpentina; J: Ventilador; K: Cámara oscura; L: Termómetro.

Capítulo 4 – Resultados y discusión

El volumen de las botellas *Roux* es 1.4 L. Las dimensiones externas de la base inferior son 120 x 55 mm y el grosor medio del vidrio es de 2 mm. La parte superior de la botella está redondeada. No obstante, a partir del área de la base y del volumen se puede calcular que el área de la superficie expuesta a la radiación es de 237 x 120 mm (0.0208 m²).

La temperatura de los dos montajes se mantiene constante a 30 ± 1 °C mediante dos serpentines sumergidos en un baño de agua, por el interior del cual circula un líquido refrigerante (20% etilenglicol – 80% agua) a 28 °C. El control de temperatura es manual con un termómetro, puesto que la temperatura no sufre grandes oscilaciones.

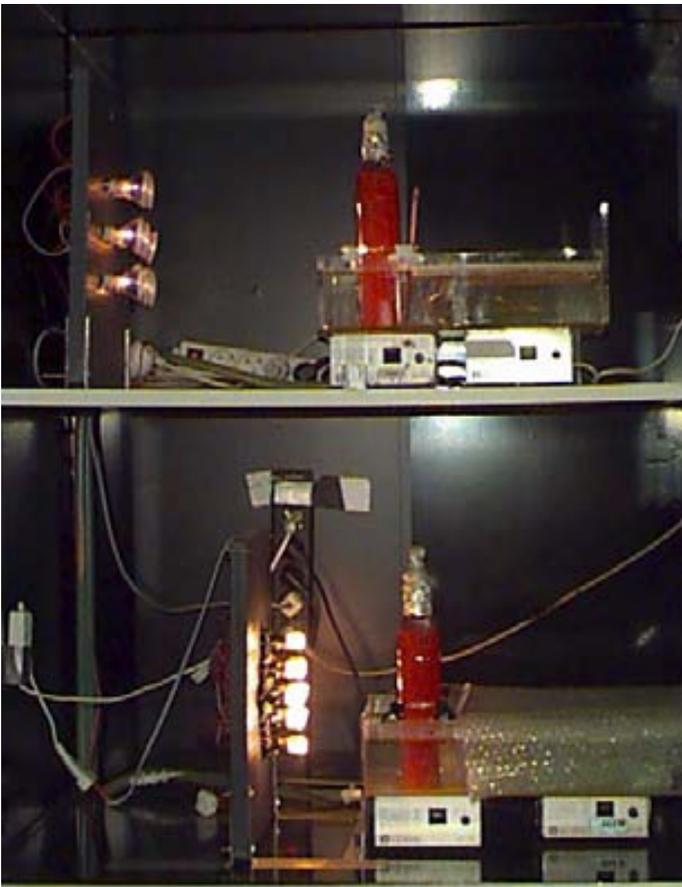


Figura 4.3: Vista general del montaje experimental utilizado.

Se ha ajustado el voltaje de los dos montajes de tal manera que la intensidad de luz sea la deseada, medida sobre una lámina de vidrio graduada, justo en la misma posición a la que se encontraría la parte frontal de la botella. Los valores de intensidad de luz medidos y su distribución se detallan en el Capítulo de materiales y métodos (página 127).

La radiación fotosintética activa (PAR) se ha medido utilizando un sensor de luz (Licor Li-190SA) conectado a un amplificador LI-189. El sensor proporciona valores de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) expresado en $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Como esta medida comprende únicamente los fotones emitidos en el rango 400-700 nm y las células de *R. rubrum* son capaces de absorber fotones en el rango 350-950 nm, se han convertido los resultados proporcionados por el sensor al rango de absorción de las células. La lectura en el rango 350-950 nm es igual a la lectura en el rango 400-700 nm multiplicada por un factor de proporcionalidad, el cual tiene en cuenta la ampliación del área bajo la curva del espectro de absorción que supone aumentar el rango de longitud de onda.

En la tabla 4.1 se resumen los experimentos realizados en este estudio, así como sus condiciones de iluminación.

Experimento	Condiciones de iluminación	PPFD \pm SE ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	350-950 nm \pm SE ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
1, 2, 3, 4 y 5	8 lámparas halógenas, 6.5 V	37.99 \pm 0.7	94.98 \pm 0.8
	9 lámparas incandescentes, 220 V	37.99 \pm 0.5	170.96 \pm 0.7
6	8 lámparas halógenas, 6.5 V	37.99 \pm 0.7	94.98 \pm 0.8
	9 lámparas incandescentes, 220 V	13.48 \pm 0.3	97.41 \pm 0.6

Tabla 4.1: Intensidades medias de luz de los diferentes experimentos llevados a cabo. S.E.: Error estándar, $SE=SD\cdot n^{-1/2}$, SD: desviación estándar. PPFD: densidad de flujo de fotones fotosintéticos.

En la primera serie de experimentos, la cantidad de fotones emitidos en el rango 400-700 nm es la misma. En cambio, el último experimento se ha llevado a cabo aportando la misma cantidad de fotones emitidos en el rango de absorción de las células, 350-950 nm.

En estos experimentos se han utilizado dos fuentes de carbono diferentes, para comprobar que las diferencias observadas como consecuencia de la variación del espectro de emisión de las lámparas no dependen de la fuente de carbono utilizada. Los experimentos número 1, 2, 3 y 6 se han realizado con ácido acético como fuente de carbono y los número 4 y 5 con ácido propiónico, siendo estos ácidos grasos la principal fuente de carbono esperada en la salida del compartimento I del bucle MELISSA.

4.1.3. Resultados y discusión

Fuente de carbono: Ácido acético

Este experimento se ha realizado por triplicado, correspondiente a los ensayos 1, 2 y 3, con la finalidad de evaluar la precisión de los resultados. En el ensayo número 1 se ha utilizado un inóculo desarrollado en ácido málico y bajo la iluminación de lámparas halógenas, mientras que en los ensayos 2 y 3 el inóculo utilizado ha sido una fracción de cultivo procedente del ensayo previo que había estado bajo iluminación procedente de las lámparas halógenas.

En todos los casos, los inóculos utilizados en los dos montajes procedían del mismo origen y el volumen utilizado ha sido exactamente el mismo, aproximadamente 400 mL, ya que utilizando volúmenes de inóculo relativamente elevados se reduce considerablemente la etapa de latencia y casi al principio del crecimiento ya se alcanza la fase lineal.

El seguimiento de los cultivos se puede apreciar en la figura 4.4, en la figura 4.5 y en la figura 4.6, correspondientes a los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente. En cada figura se ha representado la evolución de la concentración de células (g peso seco /L) y de la concentración de ácido acético (g de C/L), para los dos tipos de lámparas, frente al tiempo.

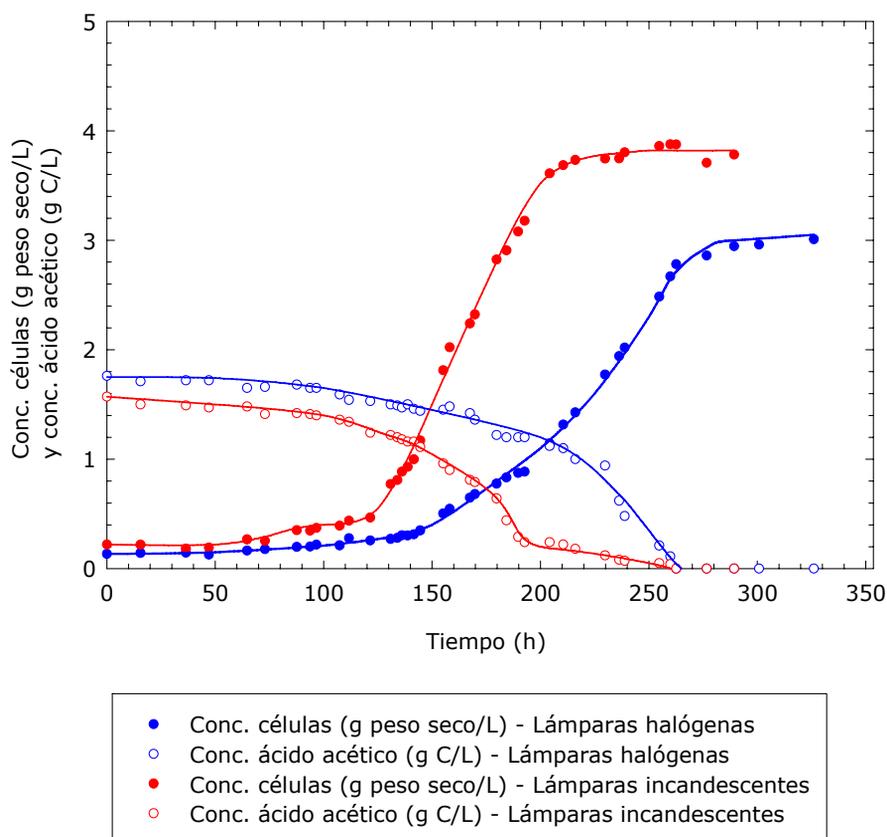


Figura 4.4: Ensayo número 1. Crecimiento de *R. rubrum* en discontinuo, con ácido acético como fuente de carbono y bajo la iluminación de dos tipos diferentes de lámparas, halógenas e incandescentes.

El crecimiento de las células se hizo midiendo la absorbancia del cultivo a 700 nm y, mediante una calibración previa (detallada en el Capítulo de materiales y métodos, página 114) se ha interpolado el peso seco.

La concentración de ácido acético se ha determinado mediante cromatografía de gases y el protocolo está detallado en el Capítulo de materiales y métodos (página 115).

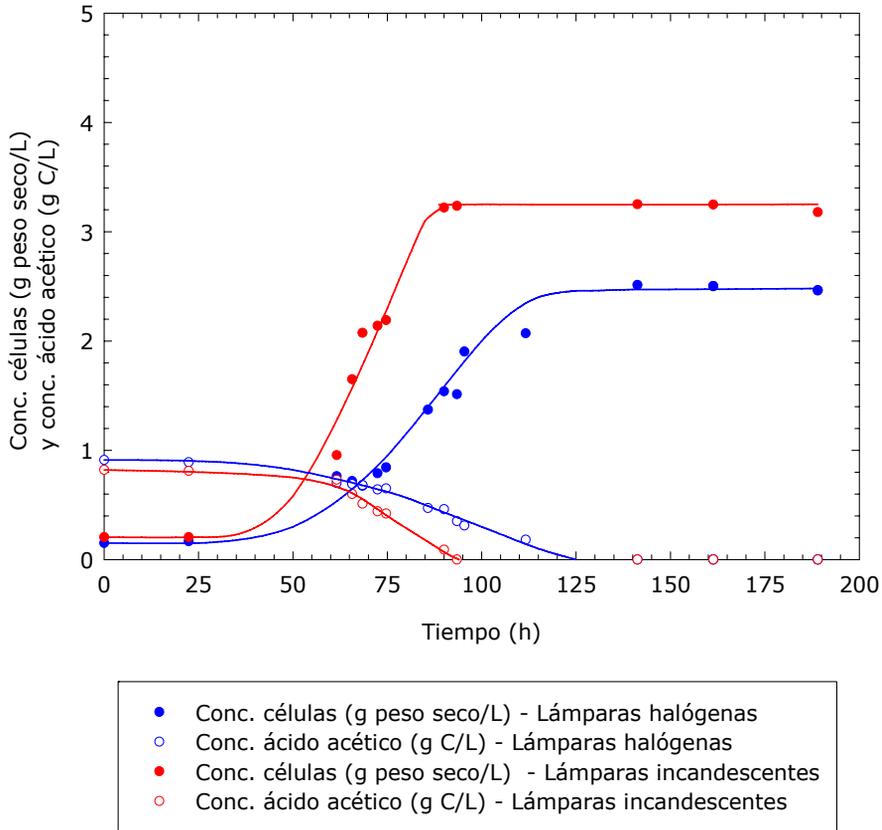


Figura 4.5: Ensayo número 2. Fuente de carbono: ácido acético.

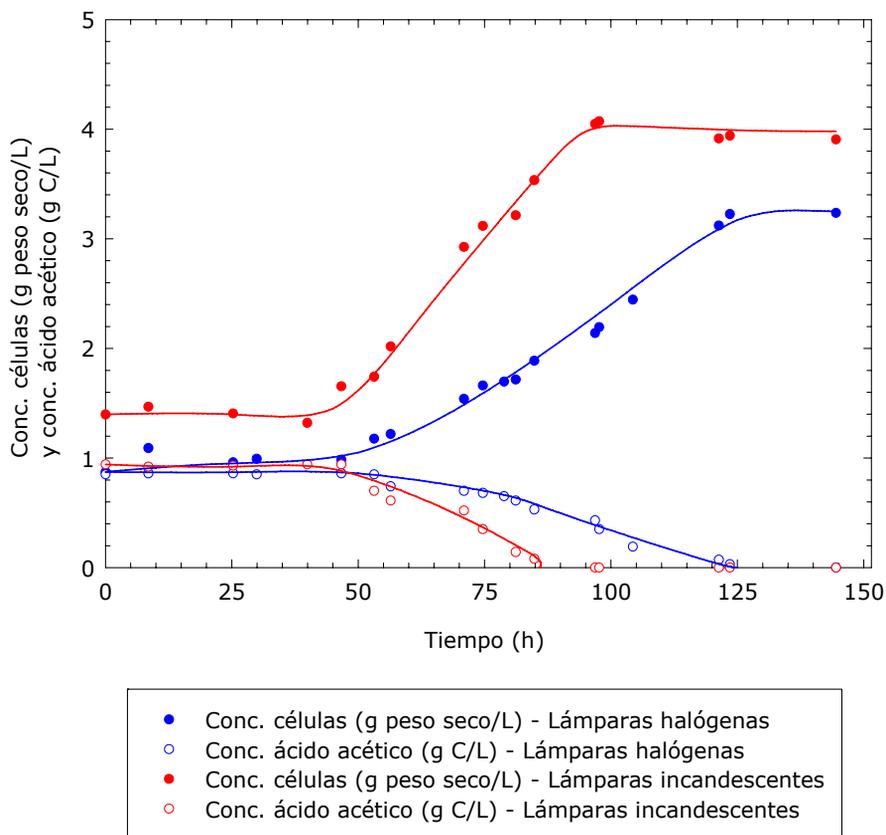


Figura 4.6: Ensayo número 3. Fuente de carbono: ácido acético.

Los resultados de estos tres ensayos se resumen en la tabla 4.2.

Evaluación de la velocidad volumétrica de crecimiento

Con la finalidad de poder comparar las velocidades de crecimiento en los diferentes experimentos es necesario utilizar un parámetro que sea constante y representativo del crecimiento. En un cultivo en discontinuo donde el aporte de luz representa un factor limitante, a medida que la densidad de células va aumentando, la luz disponible en el interior del cultivo va disminuyendo y, en consecuencia, la velocidad específica de crecimiento también disminuye. Así pues, éste no es un parámetro que se mantenga constante a lo largo de un cultivo en discontinuo.

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Contrariamente, el producto de la velocidad específica de crecimiento por la concentración de células sí que se mantiene constante durante la fase en que la luz aportada limita el crecimiento y éste es lineal respecto al tiempo. Éste producto se puede considerar como la velocidad volumétrica de crecimiento de las células, expresada en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Ensayo	Tipo de lámparas	Incremento de P.S. (g/L)	Conc. inicial ác. acético (g C/L)	Rendimiento global (g P.S./g C)	Tiempo (h)	pH final
1	Halógenas	2.88	1.76	1.63	263	7.78
	Incandescentes	3.56	1.57	2.27	216	7.89
2	Halógenas	2.31	0.91	2.54	120	7.46
	Incandescentes	2.97	0.82	3.63	90	7.61
3	Halógenas	2.36	0.85	2.78	104	7.72
	Incandescentes	2.51	0.94	2.67	124	7.75

Tabla 4.2: Resultados de los rendimientos globales. Fuente de carbono: ácido acético. P.S.: Peso seco.

Para evaluar la velocidad volumétrica de crecimiento, se han representado los puntos experimentales obtenidos utilizando iluminación halógena (figura 4.7) e iluminación incandescente (figura 4.8). Esta velocidad se calcula en la fase de crecimiento lineal, cuando éste está limitado por la luz y cuando las posibles fases de adaptación y aceleración se han acabado.

Observando estas gráficas se puede apreciar que, en general, la velocidad volumétrica de crecimiento obtenida en los tres ensayos utilizando el mismo tipo de lámpara es muy parecida y presentan una dispersión experimental baja. No obstante, en el caso de las lámparas incandescentes, el ensayo 2.B. muestra una dispersión experimental por encima de los otros y la velocidad de crecimiento que se acaba determinando difiere sustancialmente de las otras dos.

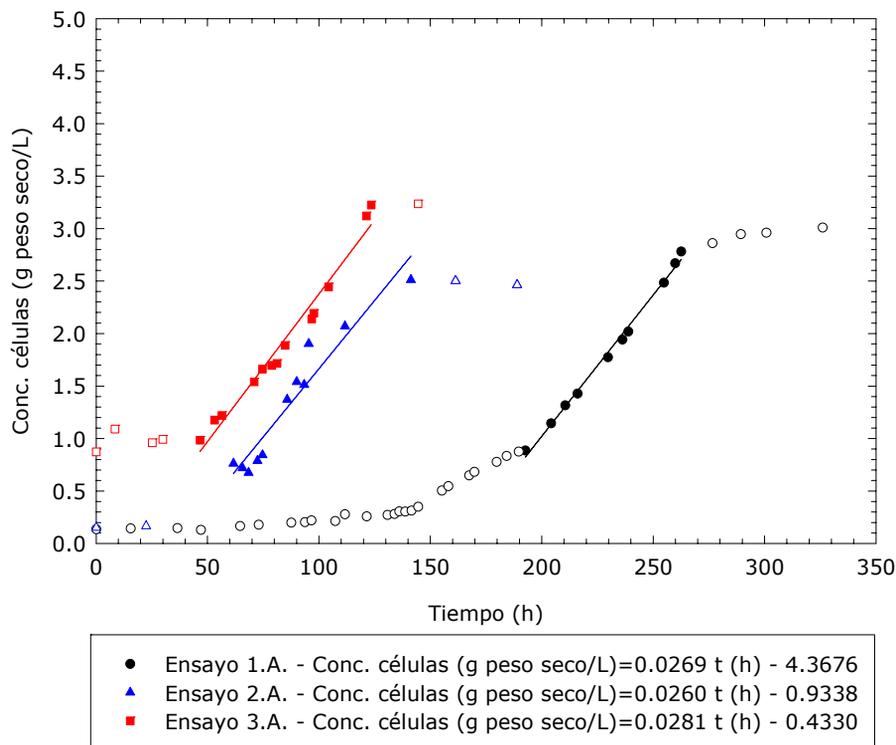


Figura 4.7: Experimentos con iluminación halógena. Fuente de carbono: ácido acético. Los símbolos rellenos corresponden a la fase lineal, mientras que los vacíos han sido despreciados en el cálculo, por alejarse del comportamiento lineal.

Aún así, se puede considerar que los cinco ensayos, exceptuando el 2.B., son coherentes con las condiciones de iluminación utilizadas y representativos del comportamiento del cultivo en estas condiciones.

En la figura 4.7 y en la figura 4.8 se puede apreciar que en el ensayo 1 la fase de latencia es considerablemente más larga que en los experimentos 2 y 3. Esto puede explicarse en base a que el inóculo utilizado en este ensayo ha crecido utilizando ácido málico como fuente de carbono, mientras que en los otros dos casos el inóculo ha crecido con ácido acético. Así, se ha reducido en gran medida el período de adaptación de las células a las nuevas condiciones en el inicio del experimento (todavía tiene que adaptarse, puesto que las condiciones de iluminación requieren un cambio en la concentración de pigmentos).

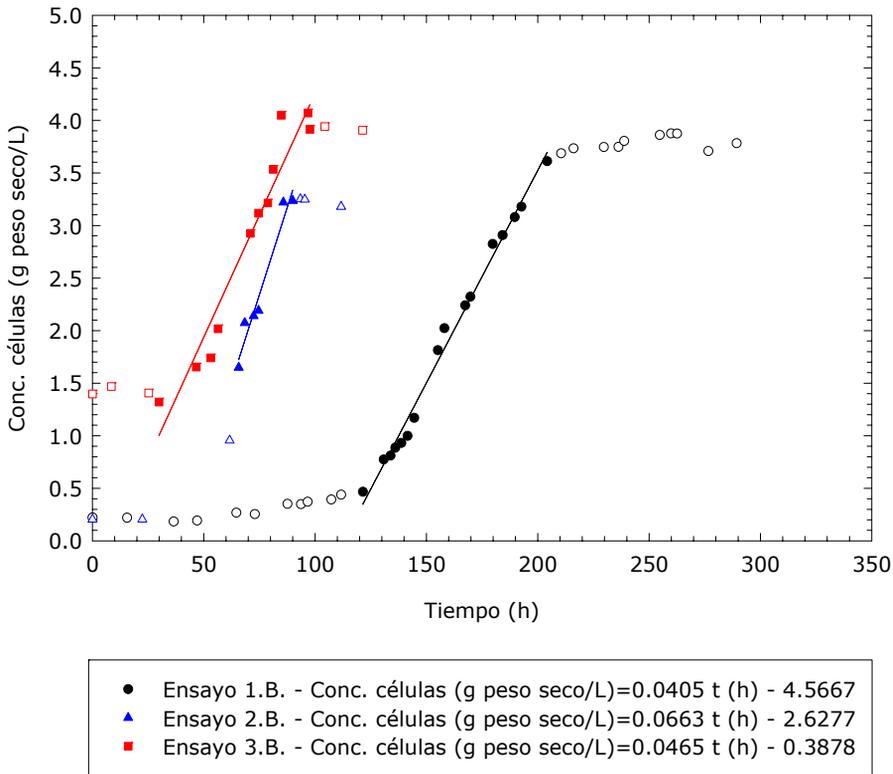


Figura 4.8: Experimentos con iluminación incandescente. Fuente de carbono: ácido acético. Los símbolos rellenos corresponden a la fase lineal, mientras que los vacíos han sido despreciados en el cálculo, por alejarse del comportamiento lineal.

En la tabla 4.3 se muestran los valores de la velocidad volumétrica de crecimiento obtenidas con los dos tipos de lámparas así como la medida de dispersión experimental.

Tipo de iluminación	Lámparas halógenas	Lámparas incandescentes
Velocidad volumétrica media de crecimiento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.027	0.051
Error estándar	$6\cdot 10^{-4}$	$8\cdot 10^{-3}$

Tabla 4.3: Velocidad volumétrica media de crecimiento en función del tipo de iluminación. Fuente de carbono: ácido acético.

Fuente de carbono: Ácido propiónico

Para conocer la influencia de la fuente de carbono y de electrones en el crecimiento de las células de *R. rubrum* cuando se utilizan diferentes tipos de fuentes de luz se han realizado dos ensayos más (ensayos 4 y 5), en los cuales se ha sustituido el ácido acético por el ácido propiónico. Igual que en los otros tres experimentos previos, se ha intentado que las condiciones ambientales de estos dos experimentos fuesen las mismas, con el objetivo de ver si los resultados son reproducibles.

En estos experimentos la intensidad de la luz se ha mantenido constante e igual que en los ensayos con ácido acético, como se puede apreciar en la tabla 4.1.

En ambos casos el volumen de inóculo utilizado ha sido de 400 mL, para minimizar la etapa de latencia y que en el inicio del crecimiento la luz ya fuese la etapa limitante de éste. Los dos inóculos habían crecido previamente en ácido acético como única fuente de carbono y bajo la iluminación de lámparas halógenas.

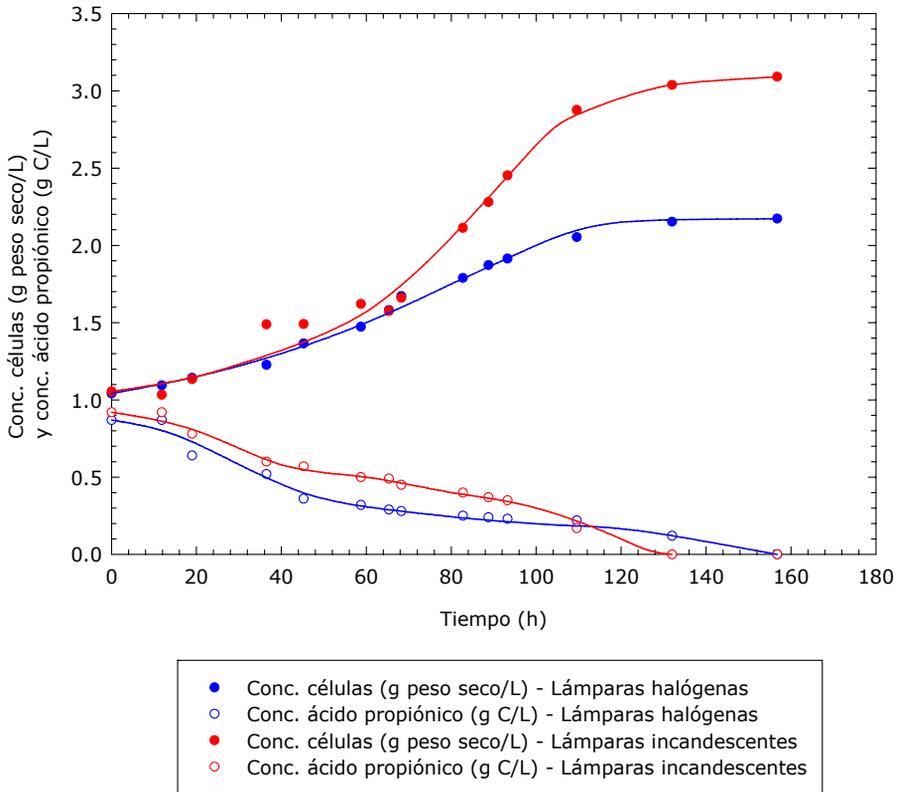


Figura 4.9: Ensayo número 4. Fuente de carbono: ácido propiónico.

En la figura 4.9 y en la figura 4.10 se puede observar la evolución de los dos experimentos frente al tiempo. Se ha medido la variación de la concentración de células y de la concentración de ácido propiónico para los dos ensayos paralelos.

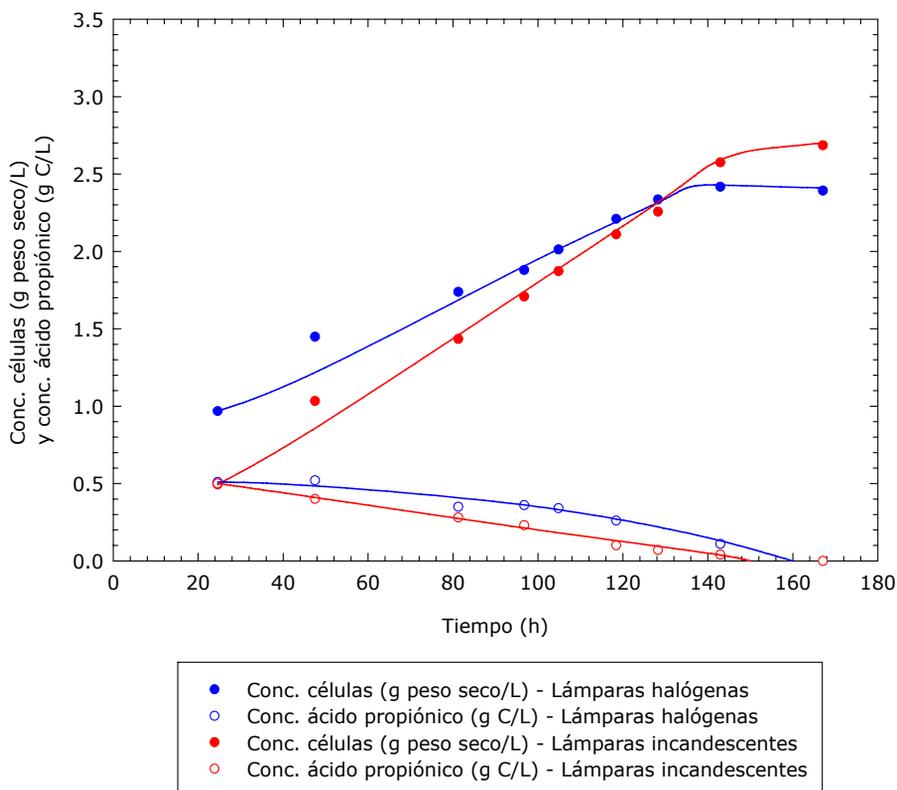


Figura 4.10: Ensayo número 5. Fuente de carbono: ácido propiónico.

Los resultados de estos dos ensayos se encuentran resumidos en la tabla 4.4.

Ensayo	Tipo de lámparas	Incremento de P.S. (g/L)	Conc. inicial ác. acético (g C/L)	Rendimiento global (g P.S./g C)	Tiempo (h)	pH final
4	Halógenas	1.12	0.87	1.29	130	7.62
	Incandescentes	2.04	0.92	2.22	140	7.80
5	Halógenas	1.42	0.51	2.78	90	7.68
	Incandescentes	2.19	0.50	4.38	150	7.73

Tabla 4.4: Resultados de los rendimientos globales. Fuente de carbono: ácido propiónico. P.S.: Peso seco.

Evaluación de la velocidad volumétrica de crecimiento

Igual que con los experimentos realizados con ácido acético como fuente de carbono, en este caso también se ha determinado la velocidad volumétrica de crecimiento mediante la representación de los resultados obtenidos experimentalmente en la figura 4.11 y en la figura 4.12.

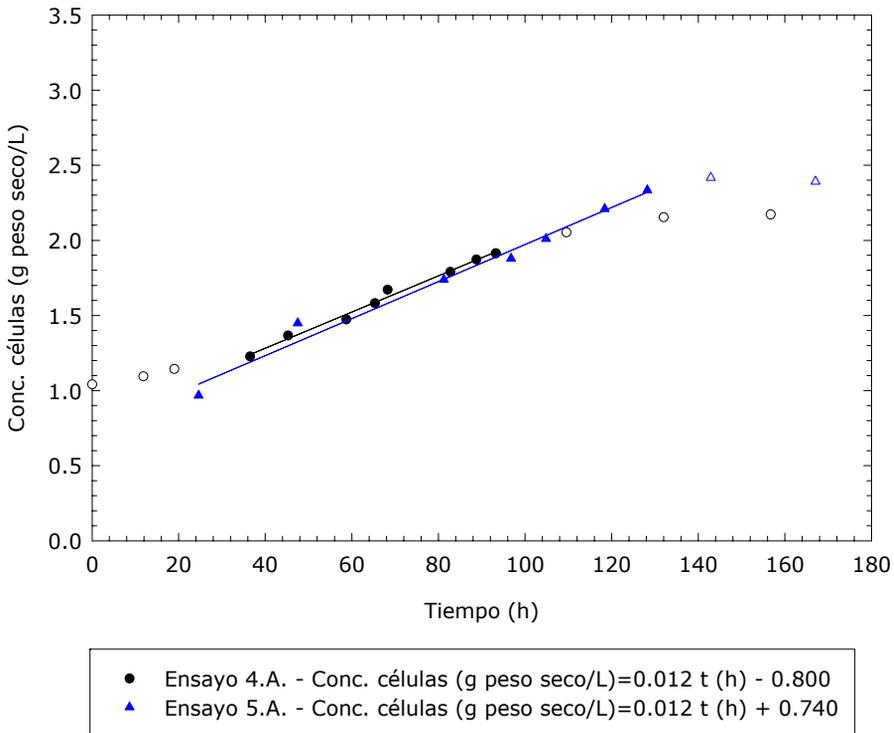


Figura 4.11: Experimentos con iluminación halógena. Fuente de carbono: ácido propiónico. Los símbolos rellenos corresponden a la fase lineal, mientras que los vacíos han sido despreciados en el cálculo, por alejarse del comportamiento lineal.

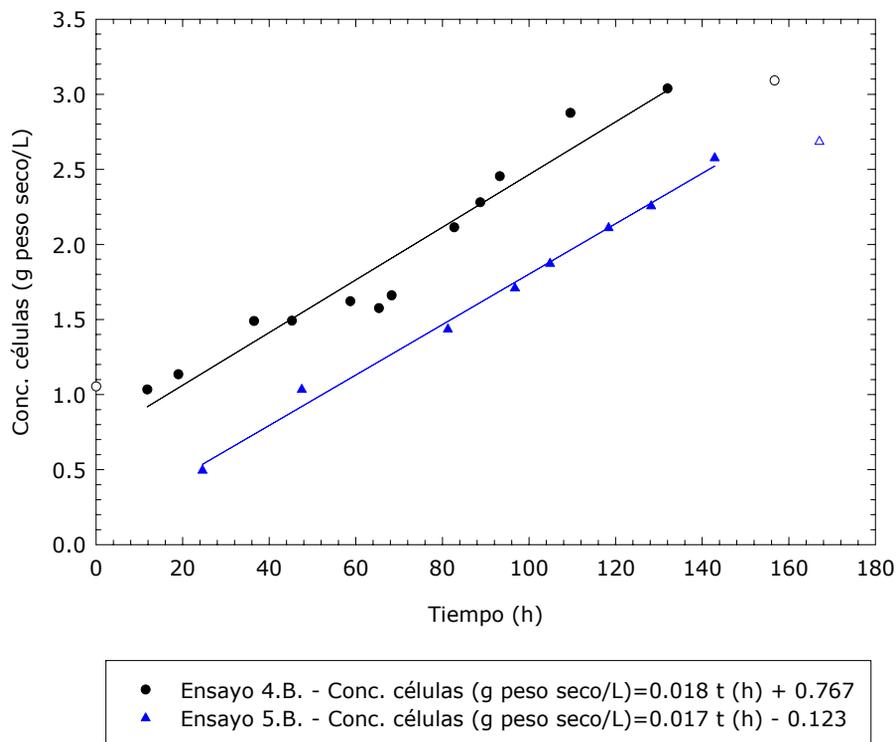


Figura 4.12: Experimentos con iluminación incandescente. Fuente de carbono: ácido propiónico. Los símbolos rellenos corresponden a la fase lineal, mientras que los vacíos han sido despreciados en el cálculo, por alejarse del comportamiento lineal.

En estas dos gráficas se puede apreciar que los experimentos realizados para determinar la velocidad volumétrica de crecimiento presentan una dispersión experimental baja para los dos tipos de iluminación. En las dos figuras sólo se han tenido en consideración los puntos pertenecientes a la fase lineal, despreciando los puntos de la fase de latencia o de la de desaceleración.

En la tabla 4.5 se resumen los valores de la velocidad volumétrica de crecimiento obtenidos en los experimentos con ácido propiónico y una estimación del error experimental.

Los resultados experimentales obtenidos, utilizando tanto ácido acético como ácido propiónico, indican que las células son capaces de crecer a velocidades volumétricas más elevadas cuando la luz que reciben es la de una lámpara incandescente, para

una misma intensidad de luz medida con el sensor de luz, siendo el rango de medida entre 400 y 700 nm.

Tipo de iluminación	Lámparas halógenas	Lámparas incandescentes
Velocidad volumétrica media de crecimiento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.012	0.017
Error estándar	$1\cdot 10^{-4}$	$3\cdot 10^{-4}$

Tabla 4.5: Velocidad volumétrica media de crecimiento en función del tipo de iluminación. Fuente de carbono: ácido propiónico.

Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que las lámparas incandescentes emiten radiación también entre 800 y 950 nm, rango en que las lámparas halógenas prácticamente no emiten radiación y que coincide exactamente con las longitudes de onda a las que absorben luz las bacterioclorofilas.

Por tanto, se puede concluir que las células, en el caso de las lámparas incandescentes, aprovechan una fracción de radiación que en las otras lámparas no está presente.

Por otro lado, la cantidad total de fotones emitidos por las lámparas incandescentes en el rango 350-950 nm es más elevada que la de las lámparas halógenas, también medida en el mismo rango. Si se considera el rango del espectro en el que las células de *R. rubrum* pueden utilizar la luz disponible, 350-950 nm, parece una consecuencia lógica, por tanto, que utilizando iluminación incandescente las células alcancen velocidades volumétricas de crecimiento superiores.

Con estos resultados obtenidos queda la duda razonable de si las células crecen más rápidamente cuando están iluminadas con lámparas incandescentes porque la cantidad total de fotones emitida, en el rango en el que ellas la pueden aprovechar, es más elevada, o bien porque las células presentan una eficacia energética más alta bajo este tipo de iluminación.

Para discernir claramente cuál es la causa de este aumento en la velocidad de crecimiento, se ha realizado otro experimento (número 6), donde se ha ajustado la

intensidad eléctrica que alimenta a las lámparas para que la cantidad total de fotones emitidos entre 350 y 950 nm sea la misma en los dos montajes experimentales, con lámparas halógenas y con lámparas incandescentes.

Así pues, la intensidad de radiación de las lámparas incandescentes en el rango 350-950 nm se ha ajustado a $97.41 \pm 0.6 \text{ } (\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$, mientras que la intensidad de las lámparas halógenas se ha mantenido constante a $94.98 \pm 0.8 \text{ } (\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$. Se ha escogido como única fuente de carbono para realizar este experimento el ácido acético, ya que la velocidad de crecimiento es más elevada y *R. rubrum* crece de forma satisfactoria en este medio.

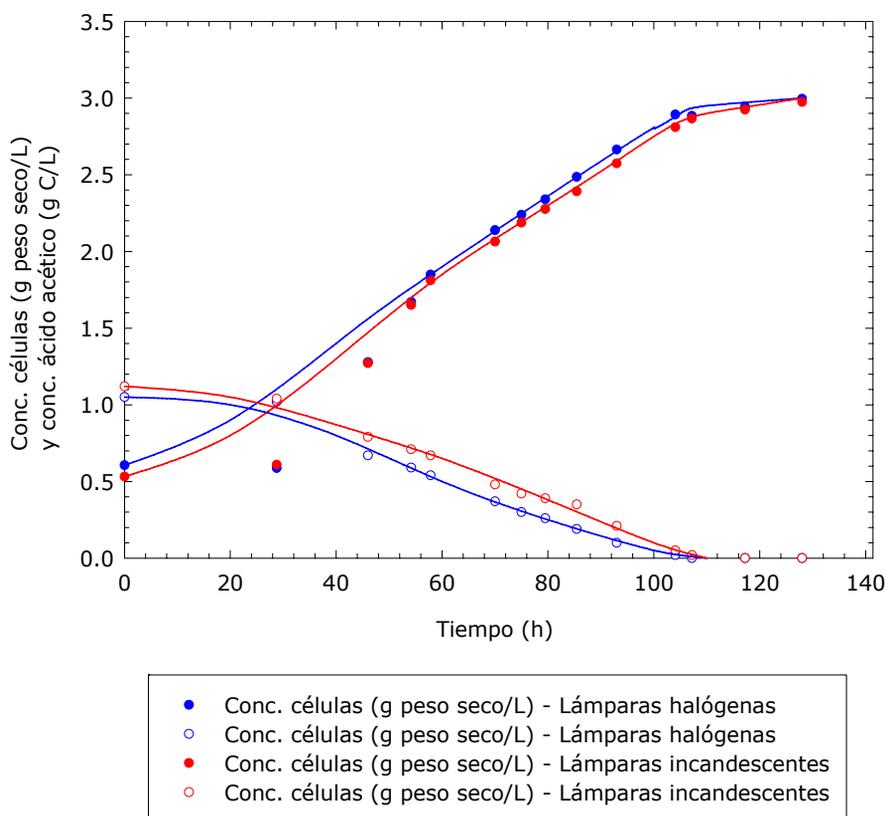


Figura 4.13: Ensayo número 6. Crecimiento de *R. rubrum* en discontinuo, con ácido acético como fuente de carbono y bajo la iluminación de dos tipos diferentes de lámparas, halógenas e incandescentes, con la misma cantidad total de fotones emitida en el rango 350-950 nm.

Capítulo 4 – Resultados y discusión

En la figura 4.13 se pueden observar los resultados experimentales obtenidos en el experimento número 6. Las velocidades volumétricas de crecimiento obtenidas son muy parecidas, independientemente del tipo de lámpara utilizado.

Ensayo	Tipo de lámparas	Incremento de P.S. (g/L)	Conc. inicial ác. acético (g C/L)	Rendimiento global (g P.S./g C)	Tiempo (h)	pH final
6	Halógenas	2.73	1.05	0.41	105	7.55
	Incandescentes	2.73	1.12	0.39	105	7.61

Tabla 4.6: Resultados de los rendimientos globales. Fuente de carbono: ácido acético.

Si se realiza una regresión lineal de los datos experimentales pertenecientes a la fase lineal de crecimiento (figura 4.14), se obtienen las velocidades volumétricas de crecimiento, que se muestran en la tabla 4.7.

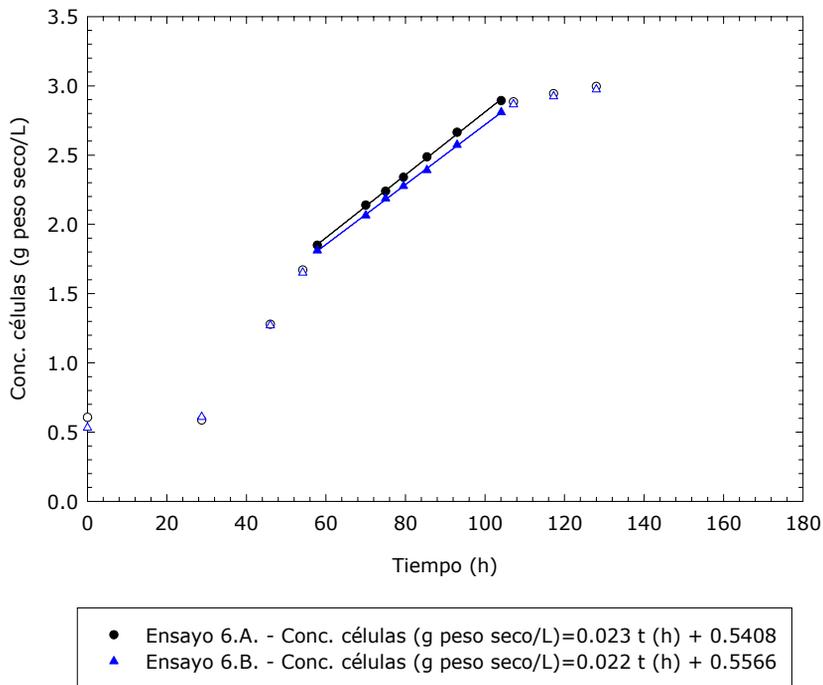


Figura 4.14: Evaluación de la velocidad volumétrica de crecimiento media para los dos tipos de lámparas. Fuente de carbono: ácido acético. Los símbolos rellenos corresponden a la fase lineal, mientras que los vacíos han sido despreciados en el cálculo, por alejarse del comportamiento lineal.

Tipo de iluminación	Lámparas halógenas	Lámparas incandescentes
Intensidad de luz media, 350-950 nm ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	94.98±0.8	97.41±0.6
Velocidad volumétrica media de crecimiento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.023	0.022

Tabla 4.7: Velocidad volumétrica de crecimiento media obtenida en el experimento 6 en función del tipo de iluminación. Fuente de carbono: ácido acético.

4.1.4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, se puede determinar que las células de *R. rubrum* captan fotones de longitud de onda superior a 700 nm y los aprovechan eficientemente. Este hecho exige trabajar con un rango del espectro ampliado a 350-950 nm.

También se ha comprobado que cuando la cantidad total de fotones enviados es la misma dentro del rango 350-950 nm, las células crecen a la misma velocidad volumétrica de crecimiento, independientemente del tipo de lámpara utilizada. Las lámparas halógenas envían mayor cantidad de fotones de menor longitud de onda (mayor energía por fotón). Sin embargo, a igualdad de fotones el crecimiento es equiparable en velocidad y rendimiento. Dicho comportamiento parece reflejar el hecho de que la energía proveniente de fotones con distinta longitud de onda y capturada por distintos tipos de pigmentos es finalmente redirigida a los centros de reacción, a partir de donde se sigue un proceso común de utilización de la energía. El efecto final es equivalente a que todos los fotones hubieran sido recogidos directamente por el centro de reacción a longitudes de onda alrededor de los 880 nm, habiéndose disipado la diferencia de energía en el proceso de transferencia. Así pues, y sin tener en consideración otros aspectos, los dos tipos de lámparas son igual de adecuados para el crecimiento de *R. rubrum*.

No obstante, desde el punto de vista energético, las lámparas halógenas envían más fotones energéticos que las lámparas incandescentes. Así pues, para una misma

cantidad total de fotones enviados, las lámparas halógenas envían más energía que las lámparas incandescentes. Como el crecimiento de las células conseguido será semejante independientemente del tipo de lámparas, pues la cantidad total de fotones enviados es la misma, las lámparas halógenas son menos eficientes que las lámparas incandescentes desde el punto de vista estrictamente energético.

Sin embargo, las lámparas incandescentes consumen más energía eléctrica para enviar la misma energía lumínica, hecho que se traduce en que las lámparas incandescentes generan mucho más calor.

Teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de los dos tipos de lámparas, se ha decidido seguir utilizando lámparas halógenas en este trabajo. Además, de este tipo de lámparas es del que se dispone más datos experimentales en el grupo de investigación.

4.2. Estudio de la influencia de la intensidad de la radiación en el crecimiento de *R. rubrum*

4.2.1. Introducción

En el cultivo de microorganismos fotosintéticos, la radiación disponible por las células desarrolla el papel de un substrato más, aunque con la particularidad que supone su transporte desde el exterior del fotobiorreactor hasta las membranas fotosintéticas de las células.

La radiación, desde que sale de la lámpara y en cada una de las direcciones en las que es emitida, se va atenuando a medida que se va abriendo paso a través de un medio participativo, es decir, aquél en el que la luz es absorbida, dispersada, reflejada o bien cualquier combinación de estos efectos. Consecuentemente, la distribución espacial de la luz es altamente heterogénea dentro del cultivo (Aiba, 1982; Cornet *et al.*, 1992; Ación Fernández *et al.*, 1997).

Generalmente, los fotobiorreactores están gobernados por la disponibilidad de energía radiante que las células tienen. La limitación del crecimiento por la luz se puede explicar sencillamente en base, por un lado, a los elevados coeficientes de extinción de las suspensiones de microorganismos y, por otro lado, por la dificultad de aportar toda la luz necesaria para el crecimiento en la mayoría de las configuraciones geométricas de los fotobiorreactores utilizados para el cultivo de microorganismos fotosintéticos a concentraciones moderadas de células (Camacho *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1997).

La necesidad de conocer y poder predecir la velocidad a la que crecerán las células de *R. rubrum* para establecer una estrategia de operación del compartimento II en el seno del bucle MELISSA, han motivado la serie de experimentos que se presentan en este apartado, en los que se plantea obtener información sobre la influencia de la intensidad de la radiación en el crecimiento de *R. rubrum*.

A diferencia de los experimentos realizados en la cámara oscura con botellas Roux, en este caso se ha optado por llevar a cabo los experimentos en un fotobiorreactor a escala piloto (*Applikon*, 2.4 L), el cual permite trabajar en continuo. Así pues, es posible seleccionar diferentes velocidades de crecimiento en las que obtener estados estacionarios y caracterizarlos, cosa que no es posible en un sistema en discontinuo.

Para variar la cantidad media de luz que tienen las células disponible, principalmente, se pueden cambiar dos parámetros: la intensidad de la iluminación incidente – irradiancia incidente (ψ_0) – o bien la velocidad de dilución del cultivo. El efecto del primero es evidente, al disminuir la cantidad de radiación emitida por la lámpara, disminuye el perfil de luz en su conjunto dentro del cultivo. En cambio, al aumentar la velocidad de dilución, la concentración de células disminuye y, en consecuencia, la atenuación de la luz también se reduce y el perfil de luz en el interior del cultivo aumenta respecto al que había. Es decir, al aumentar la velocidad de dilución, las bacterias reciben más luz individualmente.

4.2.2. Resultados y discusión

Para estudiar la relación entre la intensidad de luz incidente y la velocidad específica de crecimiento se ha utilizado el fotobiorreactor *Applikon* (características detalladas en el capítulo de materiales y métodos, página 108) y se han implementado las dos estrategias anteriormente expuestas: se ha variado la velocidad de dilución, así como la irradiancia incidente. Concretamente se ha experimentado con tres velocidades de dilución diferentes: 0.04 h^{-1} , 0.08 h^{-1} y 0.12 h^{-1} . Para cada velocidad de dilución, se ha empezado el cultivo al máximo de la intensidad de luz incidente posible en este biorreactor y, a medida que el cultivo llega a un estado estacionario, se disminuye la irradiancia incidente.

La concentración de carbono del medio de cultivo de entrada al reactor se ha ido variando acorde con el resto de condiciones, con el objetivo de asegurar que en todo momento el crecimiento está limitado por el aporte de luz y no de carbono.

Como fuente de carbono para llevar a cabo estos cultivos se ha elegido el ácido acético por varias razones. La más importante, que es ésta la fuente de carbono mayoritaria esperada en la salida del compartimento I del bucle MELISSA. Además, es una fuente de carbono con la que *R. rubrum* crece de forma satisfactoria y de la que más resultados y experiencia se posee.

Para alcanzar la primera velocidad de dilución escogida, 0.04 h^{-1} , se ha optado por aumentar de forma progresiva la velocidad de dilución desde el final del cultivo en discontinuo, para que las células se vayan adaptando a las nuevas condiciones. Así se ha llevado a cabo el experimento en continuo que se representa en la figura 4.15, el cual empieza en el final de un cultivo en discontinuo. La irradiancia incidente es de

4858 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la concentración de fuente de carbono –ácido acético– en el medio de entrada de 1 g C/L. La primera velocidad de dilución ensayada (parte I) es 0.02 h^{-1} y cuando se alcanza el estado estacionario (1.61 g/L de peso seco) se aumenta a 0.04 h^{-1} , sin que la concentración de células varíe significativamente. Este hecho se atribuye a la alta afinidad que tienen las células de *R. rubrum* por el ácido acético, haciendo que la variación de la concentración de células sea despreciable al aumentar la velocidad de dilución. Por tanto, se puede concluir que el crecimiento se encuentra limitado por el aporte de carbono.

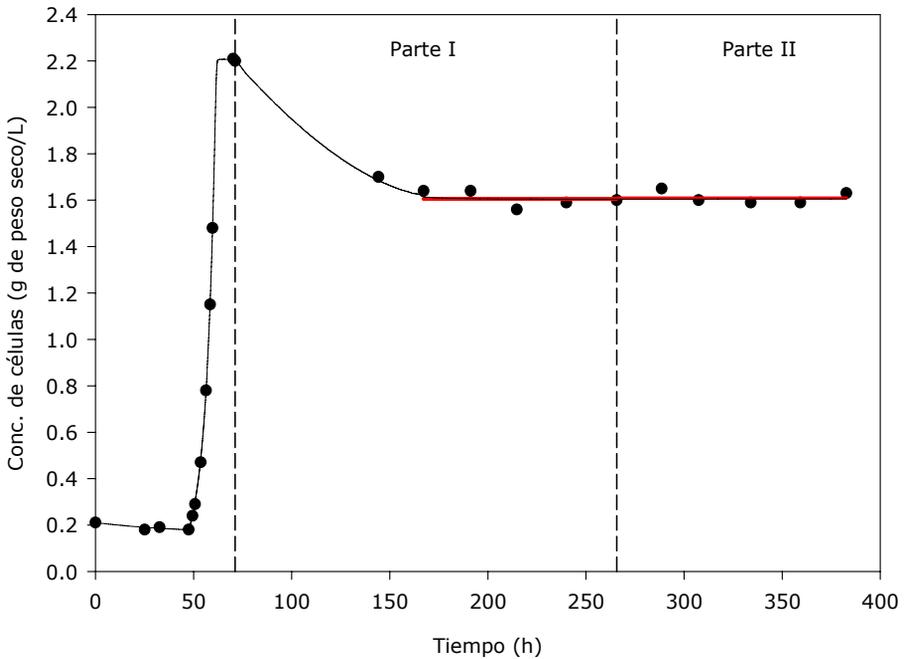


Figura 4.15: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $\psi_0=4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 1 g C/L. Parte I: $D=0.02 \text{ h}^{-1}$; Parte II (MC núm. 1): 0.04 h^{-1} . Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. Acético	Á. Acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	1.0	1.0
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.02	0.04
Tiempo de residencia, τ (h)	50	25
Número de tiempos de residencia	3.9	4.7
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	4858	4858
Peso seco (g C/L)	1.61 \pm 0.02	1.61 \pm 0.01

Tabla 4.8: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.15)

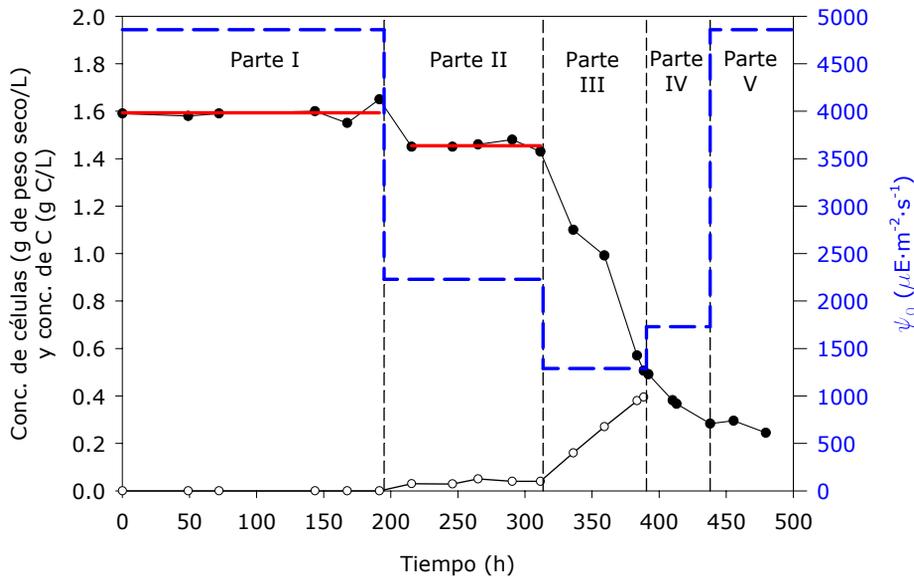


Figura 4.16: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $D=0.04 h^{-1}$ y 1 g C/L. Parte I (MC núm. 2): $\psi_0=4858 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Parte II (MC núm. 3): $\psi_0=2229 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Parte III (MC núm. 4): $\psi_0=1290 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Parte IV: $\psi_0=1730 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Parte V: $\psi_0=4858 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

En la figura 4.16 se representa los resultados obtenidos en un ensayo en que las condiciones del primer experimento en continuo son iguales a las del experimento anterior (figura 4.15, parte II), con el objetivo de comprobar la concordancia entre dos experimentos diferentes (parte I). El resultado indica que dentro la precisión de las medidas, toda la fuente de carbono es consumida y la concentración de células se sitúa sobre 1.60 g/L de peso seco.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. Acético	Á. Acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	1.0	1.0
Velocidad de dilución, D (h ⁻¹)	0.04	0.04
Tiempo de residencia, τ (h)	25	25
Número de tiempos de residencia	7.8	4.7
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	4858	2229
Peso seco (g/L)	1.59±0.01	1.45±0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	0.038±0.001

Tabla 4.9: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.16). L.D.: Limite de detección.

Cuando habían transcurrido 195 horas de cultivo continuo, se variaron las condiciones de cultivo bajando la irradiancia incidente, pasando de 4858 a 2229 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En consecuencia, el peso seco disminuyó hasta estabilizarse en 1.45 g/L y empezó a aparecer una cierta concentración de ácido acético sin consumir en el cultivo, 0.038 g C/L. Posteriormente, la irradiancia incidente fue disminuida aún más, hasta 1290 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, provocando diferentes efectos en el cultivo. Por un lado, la concentración de fuente de carbono sin consumir empezó a aumentar de forma lineal con el tiempo. Por otro lado, y de forma simultánea, las células de *R. rubrum* empezaron a formar agregados macroscópicos de células y a adherirse a la superficie interna de cristal del reactor, disminuyendo de forma drástica la concentración de células en suspensión y apantallando la luz que llegaba al cultivo. Una posible explicación de este comportamiento podría ser que una irradiancia incidente de 1290 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sea suficientemente baja para mantener a las células creciendo a esa velocidad de dilución. Para comprobar esta hipótesis y determinar qué cantidad de radiación sería la mínima suficiente para mantener el cultivo en condiciones estacionarias a esa

velocidad de dilución, se aumentó la irradiancia incidente a $1730 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sin embargo, las células continuaron agregándose y adhiriéndose al cristal del reactor. Claramente es un sistema inestable, puesto que cuantas más células se adhieran al cristal apantallando la luz, menor será la luz que estará disponible para las células en suspensión. Al no producir ningún efecto al aumentar ligeramente la intensidad de luz, se restablecieron las condiciones de iluminación iniciales ($4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), las cuales habían demostrado ser suficientes para mantener el crecimiento de las células. No obstante, no se observó ningún cambio en cuanto a la concentración de células. Así, se observó que una vez las células se empiezan a adherir al cristal del reactor, el proceso ya no se puede revertir cuando se restablecen las condiciones iniciales del experimento.

En la figura 4.17 se puede apreciar la apariencia del fotobiorreactor cuando las células de *R. rubrum* se adhieren a la pared de cristal. Curiosamente, toda la pared interna del reactor queda cubierta por una capa gruesa de agregados macroscópicos de células, excepto en la superficie de delante de las lámparas.

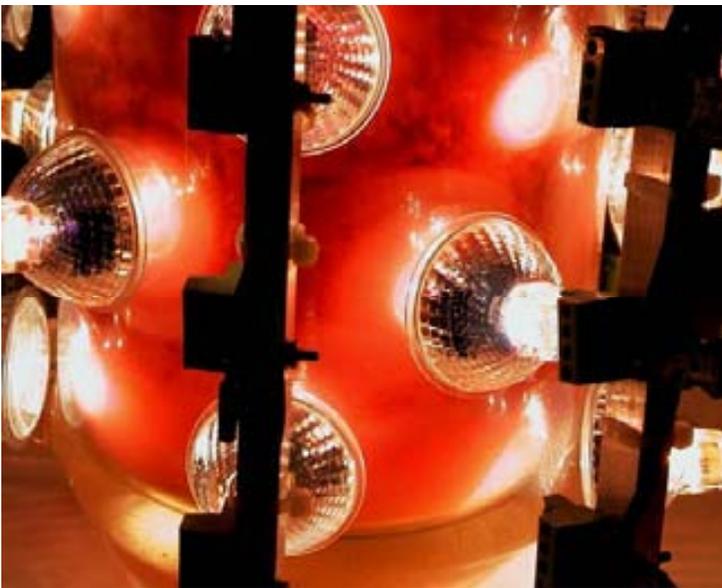


Figura 4.17: Células de *R. rubrum* adheridas en la pared de cristal del reactor.

En la figura 4.18 y en la figura 4.19 se muestran observaciones microscópicas de células de *R. rubrum*. En ellas se puede observar que las células presentan inclusiones intracelulares que brillan en el microscopio óptico. Además, las células están inmóviles y tienden a formar agregados. Inicialmente, cuando estos agregados empiezan a formarse, se componen de pocas células (agregados microscópicos) y están en suspensión. Pero, cuando el cultivo lleva en estas condiciones varios días, los agregados de células están ya compuestos por un número muy elevado de células (ya son agregados macroscópicos) y se adhieren a las paredes internas del reactor. Prácticamente todas las células del cultivo se encuentran en este estado.



Figura 4.18: Células de *R. rubrum* con gránulos intracelulares. 1000 x. Cuando las células presentan este estado morfológico, posteriormente acaban adhiriéndose a la superficie interna del reactor.



Figura 4.19: Células de *R. rubrum* con gránulos intracelulares formando un agregado de células microscópico. 1000 x.

En la figura 4.20 se muestran los resultados obtenidos en el primer experimento en continuo llevado a cabo a una velocidad de dilución de 0.08 h^{-1} , utilizando una irradiancia incidente de $8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Inicialmente se estableció una velocidad de dilución de 0.04 h^{-1} (parte I) y cuando el peso seco era cercano al del estado estacionario (1.59 g/L), se aumentó la velocidad de dilución a 0.08 h^{-1} . Al hacer este cambio, empezó a aparecer parte de la fuente de carbono sin consumir, cantidad muy pequeña pero dentro del límite de detección del análisis. Conjuntamente, las células de *R. rubrum* empezaron a formar agregados y a adherirse a la pared del reactor, disminuyendo la luz disponible para el cultivo. A medida que el experimento avanzaba en el tiempo, las células se fueron depositando en las paredes hasta que el cultivo acabó lavándose.

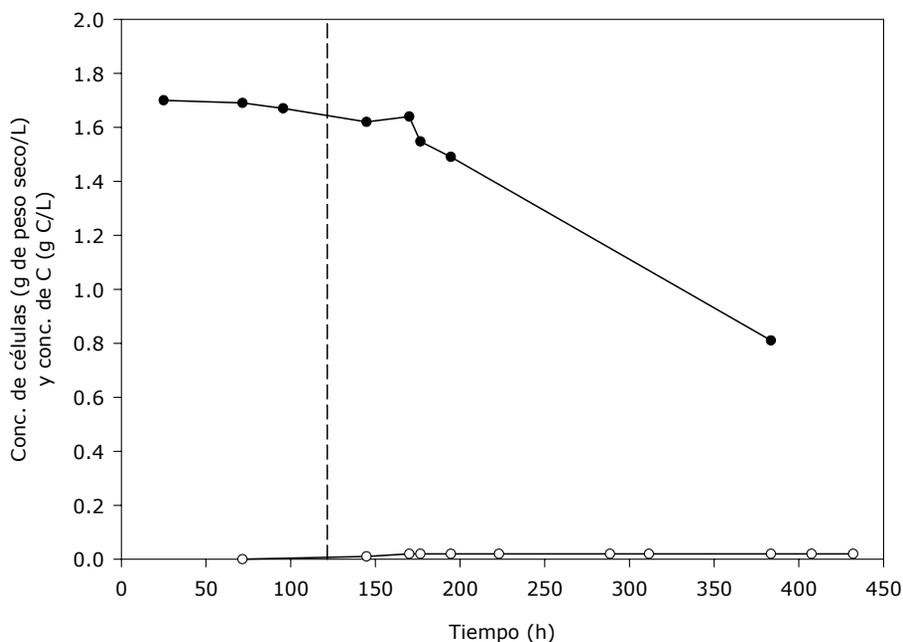


Figura 4.20: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $\psi_0=8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 1 g C/L. Parte I: $D=0.04 \text{ h}^{-1}$; Parte II: $D=0.08 \text{ h}^{-1}$.

Como primera hipótesis, parece que las células de *R. rubrum* son muy sensibles a la concentración de carbono del cultivo. Cuando ésta empieza a aumentar, como resultado de que consumen menos carbono en términos absolutos, las células cambian su morfología y dejan de crecer.

Así pues, para tener el cultivo creciendo a 0.08 h^{-1} de forma satisfactoria, la concentración de la fuente de carbono en el medio de entrada se redujo a la mitad. En la figura 4.21 se muestran los resultados del experimento llevado a cabo a 0.08 h^{-1} y 0.5 g C/L , siendo el ácido acético la fuente de carbono.

El primer estado estacionario obtenido a 0.08 h^{-1} fue llevado a cabo utilizando una irradiancia incidente de $8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte I). Cuando el peso seco estaba estable entorno a 0.83 g/L y no quedaba fuente de carbono residual sin consumir, se disminuyó la cantidad de radiación. La nueva irradiancia incidente se fijó en $6486 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte II), sin que la concentración de células ni el carbono sin consumir acusasen cambios apreciables. Después de más de 70 horas en estas condiciones, se

realizó otra disminución en la radiación aportada, situando la irradiancia incidente en $4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte III). Este cambio provocó una ligera disminución en la concentración de células (0.79 g/L) aunque toda la fuente de carbono continuó siendo consumida.

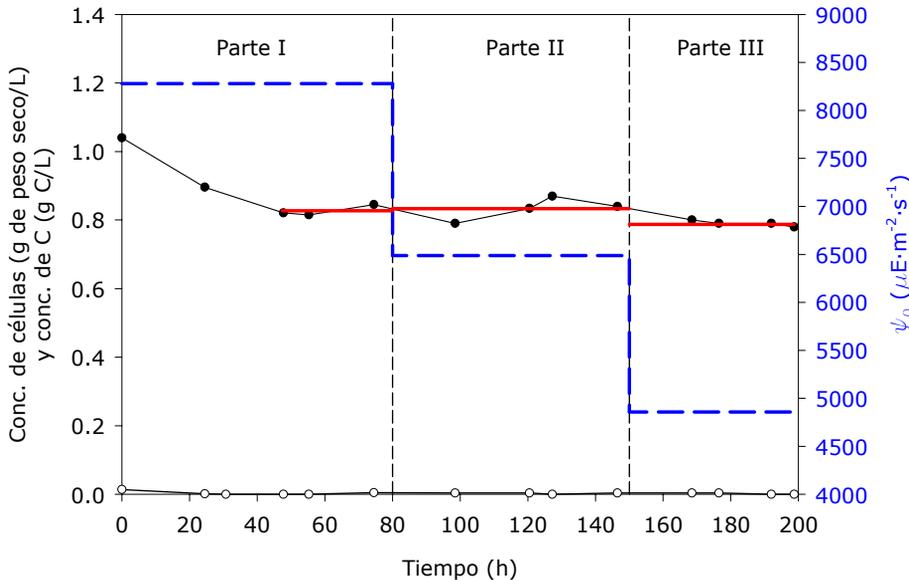


Figura 4.21: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $D=0.08 \text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I (MC núm. 5): $\psi_0=8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II (MC núm. 6): $\psi_0=6486 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte III (MC núm. 7): $\psi_0=4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Después de un análisis microscópico de una muestra obtenida al final de la parte III del cultivo, se constató que las células se encontraban activas, sin gránulos en su interior, móviles, y sin formar agregados. Esto podría confirmar la hipótesis que cuando no hay ácido acético acumulado en exceso, el cultivo se mantiene de forma satisfactoria a esta velocidad de dilución y a esta intensidad de luz.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II	Parte III
Fuente de carbono	Á. Acético	Á. Acético	Á. Acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.08	0.08	0.08
Tiempo de residencia, τ (h)	12.5	12.5	12.5
Número de tiempos de residencia	6.4	5.6	3.9
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	8279	6486	4858
Peso seco (g/L)	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.02	0.79 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.10: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.21). L.D.: Límite de detección.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del cultivo a esta velocidad de dilución y a niveles más bajos de iluminación, se llevó a cabo otro experimento en continuo con el resto de condiciones constantes, los resultados del cual se muestran en la figura 4.22 y en la tabla 4.11.

Para comprobar la reproducibilidad de los experimentos, el primer estado estacionario ensayado fue en condiciones idénticas al del último estado estacionario del experimento anterior — con una irradiancia incidente de $4858 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ — (parte III en la figura 4.21 y parte I en la figura 4.22). Los resultados obtenidos fueron plenamente coincidentes.

A continuación, la irradiancia incidente fue disminuida a $3441 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (parte II). En estas condiciones la concentración de células sufría ciertas oscilaciones, por lo que fue necesario prolongar la duración del estado estacionario para disponer de más valores de peso seco. Dentro del margen de error del resultado, el peso seco obtenido no varió significativamente del obtenido en el estado estacionario precedente (0.80 g/L).

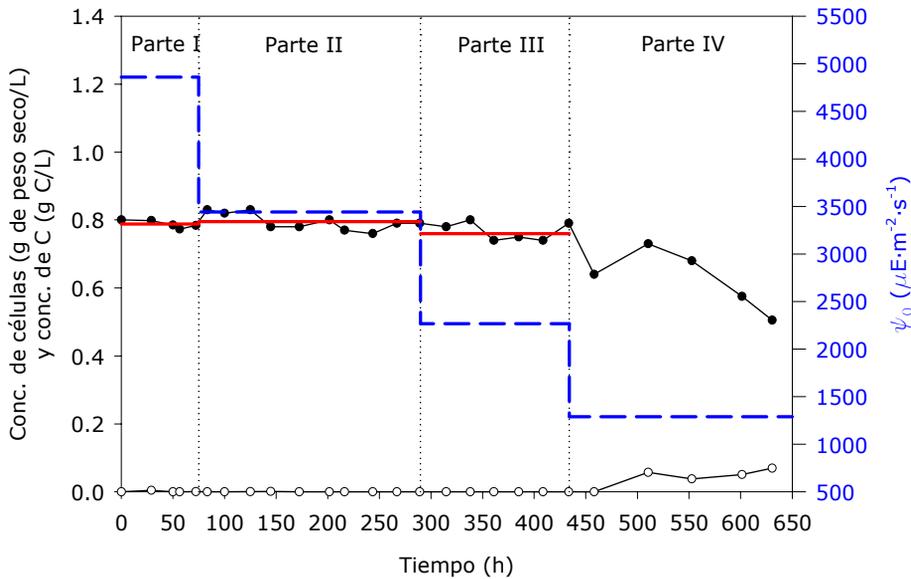


Figura 4.22: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $D=0.08\text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I: $\psi_0=4858\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II (MC núm. 8): $\psi_0=3441\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte III (MC núm. 9): $\psi_0=2266\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte IV (MC núm. 10): $\psi_0=1290\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II	Parte III
Fuente de carbono	Á. Acético	Á. Acético	Á. Acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5	0.5
Velocidad de dilución, $D\ (\text{h}^{-1})$	0.08	0.08	0.08
Tiempo de residencia, $\tau\ (\text{h})$	12.5	12.5	12.5
Número de tiempos de residencia	6.0	17.2	11.5
Irradiancia incidente, $\psi_0\ (\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1})$	4858	3441	2266
Peso seco (g/L)	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.76 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.11: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.22). L.D.: Limite de detección.

Posteriormente, la radiación se volvió a reducir, hasta un valor de irradiancia incidente de $2266 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El peso seco disminuyó sensiblemente, situándose en torno a 0.76 g/L aunque continuó sin aparecer ácido acético sin consumir en el cultivo. Una vez más se volvió a reducir la cantidad de radiación aplicada al cultivo, situando la irradiancia incidente en $1290 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte IV). Aunque parecía inicialmente que el peso seco se estabilizaría entorno al valor de 0.66 g/L , empezó a aparecer ácido acético residual en el cultivo y las células de *R. rubrum* formaron agregados que posteriormente se adherirían en la pared del fotobiorreactor. El experimento tuvo que ser detenido porque todas las células en suspensión del cultivo se lavaron.

Para conocer el comportamiento de las células de *R. rubrum* creciendo a velocidades específicas superiores y también para seguir estudiando el hecho de que cuando aparece ácido acético residual en el cultivo, el crecimiento de las células se dificulta, se planificó llevar a cabo un experimento a una velocidad de dilución de 0.12 h^{-1} . Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.23 y en la tabla 4.12.

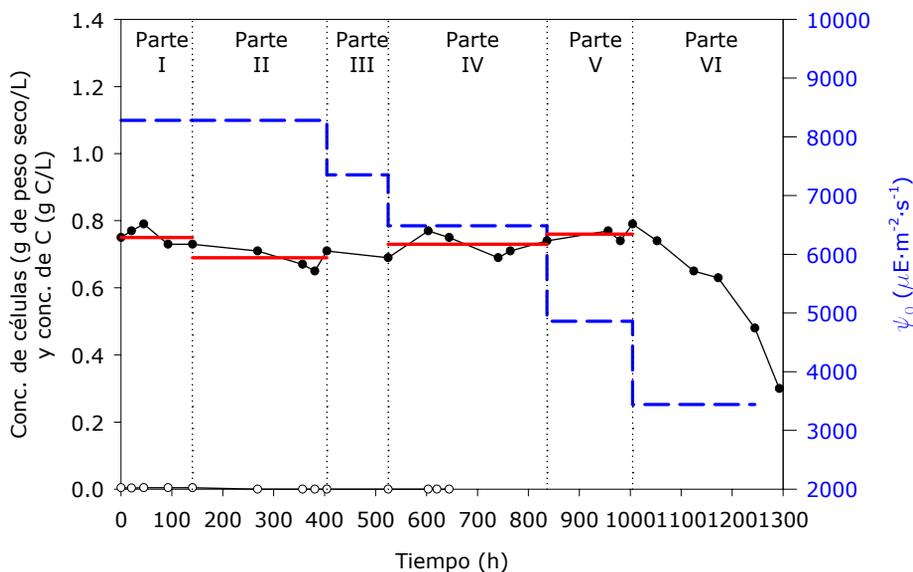


Figura 4.23: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono. $D=0.12 \text{ h}^{-1}$. Parte I (MC núm. 11): $\psi_0=8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.5 g C/L ; Parte II (MC núm. 12): $\psi_0=8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.4 g C/L ; Parte III: $\psi_0=7351 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.4 g C/L ; Parte IV (MC núm. 13): $\psi_0=6486 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.4 g C/L ; Parte V (MC núm. 14): $\psi_0=4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.4 g C/L ; Parte VI (MC núm. 15): $\psi_0=3441 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.4 g C/L . Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II	Parte IV	Parte V
Fuente de carbono	Á. Acético	Á. Acético	Á. Acético	Á. Acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.4	0.4	0.4
Velocidad de dilución, D (h ⁻¹)	0.12	0.12	0.12	0.12
Tiempo de residencia, τ (h)	8.3	8.3	8.3	8.3
Número de tiempos de residencia	16.9	31.7	37.4	20.2
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	8279	8279	6486	4858
Peso seco (g/L)	0.75±0.01	0.69±0.02	0.73±0.02	0.76±0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	4·10 ⁻³	<L.D.	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.12: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.23). L.D.: Límite de detección.

El experimento se inició a la máxima irradiancia incidente posible, 8279 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y utilizando una concentración de fuente de carbono de 0.50 g C/L en el medio de entrada al fotobiorreactor (parte I). El peso seco se estabilizó en 0.75 g C/L y apareció en el cultivo una concentración muy baja de fuente de carbono sin consumir. Mediante análisis microscópico del cultivo se comprobó que las células empezaban a variar su morfología habitual, alargándose como para dividirse en dos, pero sin llegar a escindirse al final.

Para evitar la acumulación de ácido acético en el cultivo, que hubiese significado el final del mismo, y al no poder incrementar la cantidad de radiación aportada, se optó por disminuir la concentración de carbono del medio de entrada en un 20%. Con la nueva concentración de carbono, 0.40 g C/L, se obtuvo un estado estacionario con 0.69 g/L de peso seco y sin que se apreciase carbono residual en el cultivo (parte II).

En estas condiciones, las células recuperaron la velocidad específica de crecimiento y el experimento en continuo se prosiguió de forma satisfactoria.

A continuación se volvió a disminuir la irradiancia incidente, en un doble escalón para suavizar el cambio, primero y brevemente se situó en $7351 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte III) y después en $6486 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte IV). En estas condiciones últimas, las células de *R. rubrum* empezaron a acumular en su interior gránulos, aunque no de forma considerable. El peso seco se conservó alrededor de 0.73 g/L, aunque con importantes oscilaciones en la medida (posiblemente debido a la presencia de pequeños agregados de células que hacían que las medidas de peso seco fuesen poco reproducibles). Por esta razón, se prolongó durante tanto tiempo este estado estacionario.

Una vez más, se volvió a disminuir la luz aportada, situando la irradiancia incidente en esta nueva fase (parte V) en $4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A pesar de que el peso seco sufría variaciones, pareció estabilizarse alrededor de 0.76 g/L, aunque la presencia de agregados de células en el cultivo era considerable. Posiblemente en estas condiciones el cultivo estaba al límite de mantenerse creciendo a una velocidad específica de 0.12 h^{-1} . Cuando se volvió a reducir la irradiancia incidente, a $3441 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (parte VI), el cultivo se lavó.

4.2.3. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos experimentos, se pueden extraer las conclusiones que se detallan a continuación.

En todos los experimentos llevados a cabo en continuo en los que se va disminuyendo progresivamente la aportación de luz al cultivo, se observa que al reducir la irradiancia incidente, la concentración de células en el estado estacionario también disminuye, de tal manera que al haber menos células, la cantidad de energía que toca por célula sigue siendo la misma que había antes del cambio en la intensidad de la luz. Esta energía es la mínima necesaria que necesita la célula para poderse mantener en crecimiento a la velocidad de dilución del experimento.

También se ha observado que en las tres velocidades de dilución en las que se han llevado a cabo experimentos en continuo con *R. rubrum* utilizando como fuente de carbono ácido acético, se ha puesto de manifiesto que, en diferentes ocasiones, cuando el ácido acético empieza a aparecer sin ser consumido en el cultivo, las

células cambian su morfología de forma gradual y lenta pero difícilmente irreversible. Este cambio empieza por la inclusión de gránulos en el interior de las células, habiendo casos en que las células quedan deformadas por el tamaño de los cristales intracelulares. Después, las células siguen creciendo a lo largo como si fuesen a dividirse en dos, pero sin llegar a escindir-se. Esto hace que las células lleguen a tener una longitud de hasta 4 y 5 veces la longitud de una célula normal. Cuando las células presentan esta longitud, ya no son capaces de desplazarse en el líquido del cultivo y se agregan entre ellas, llegando a formar agregados macroscópicos que se adhieren a las paredes de cristal del fotobiorreactor, hasta que cubren toda la superficie útil de iluminación. Cuando las células empiezan este cambio de morfología, si no se para el cultivo en continuo, éste se acaba lavando. La única manera observada de revertir este proceso consiste en, cuando las células empiezan a presentar inclusiones intracelulares, volver al cultivo en discontinuo de forma que las células que aún no se han visto afectadas, consuman el exceso de ácido acético del cultivo. Cuando se ha agotado el exceso de fuente de carbono en el cultivo, todas las células vuelven muy lentamente a su morfología habitual.

Teniendo en cuenta todas estas observaciones, se concluye que las células de *R. rubrum* son muy sensibles a la concentración de ácido acético que hay en el cultivo hasta el punto que cuando la concentración es superior a 0.1 g/L de carbono, las células ya desencadenan una serie de cambios morfológicos y metabólicos.

Estos hechos parecen indicar que existe una combinación de irradiancia incidente y concentración de ácido acético que permite la correcta operación del biorreactor. La reducción de la irradiancia incidente disminuye el consumo de ácido acético de una forma satisfactoria y desencadena un mecanismo de acumulación de carbono. La falta de movilidad de la célula puede ser consecuencia del limitado aporte de energía, el cual probablemente conduce a una baja disponibilidad de ATP. Por tanto, en este punto, los factores combinados de baja disponibilidad de energía y elevados niveles de ácido acético pueden ser propuestos como los factores desencadenantes del mecanismo de acumulación de carbono intracelular y de que las células cambien su morfología y se acaben adhiriendo al reactor.

Los análisis de la composición celular que se han realizado a muestras de células tomadas en los diferentes estados estacionarios, han verificado que los gránulos intracelulares observados en el microscopio son formados generalmente por β -polihidroxitirato (PHB), aunque en ocasiones también se ha acumulado

glicógeno. Es probable que la acumulación de gránulos de PHB intracelulares venga dada por la relación entre la cantidad de radiación disponible y la concentración de ácido acético libre en el cultivo. Cuando esta relación es baja, no existe suficiente energía disponible para consumir completamente la fuente de carbono y el carbono libre se acumula en el interior de la célula en forma de PHB.

Los diferentes estados estacionarios llevados a cabo (excepto la parte II de la figura 4.15) podrían haberse obtenido bajo limitación de carbono en vez de limitación por luz, puesto que en la mayoría de casos, cuando la fuente de carbono se acumula, y por tanto deja de ser limitante, aparecen los fenómenos de adhesión, formación de agregados, etc. Cuando el crecimiento está limitado por la luz, las células cambian su morfología y no crecen de forma satisfactoria. Por lo tanto, estos experimentos permiten aproximar la cantidad de luz necesaria para obtener un crecimiento satisfactorio a una determinada velocidad de dilución.

En los siguientes experimentos, se estudiará si este comportamiento que se ha observado cuando la fuente de carbono es ácido acético, también se produce con otras fuentes de carbono.

4.3. Estudio de la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de *R. rubrum*

4.3.1. Introducción

Los organismos fotoheterotróficos, y particularmente el género *Rhodospirillaceae*, utilizan la fuente de carbono también como fuente de electrones durante el proceso fotosintético. Esto les permite sintetizar bloques constituyentes que después serán utilizados para el crecimiento celular. Consecuentemente, existe una relación directa entre la cantidad de energía suministrada y la fuente de carbono consumida.

Dentro del bucle MELISSA, el cometido de *R. rubrum* consiste en consumir los ácidos grasos volátiles presentes en la salida del primer compartimento. La composición de esta corriente depende de las condiciones a las que opera el biorreactor del Compartimento I, siendo los principales ácidos grasos volátiles los que se detallan en la tabla 1.5. No obstante, se espera que las fuentes de carbono con presencia mayoritaria sean en primer lugar el ácido acético, y a continuación, el ácido propiónico y el ácido butírico.

Atendiendo a los resultados obtenidos utilizando ácido acético como fuente de carbono, en los que en función de la concentración de carbono residual en el cultivo y la irradiancia incidente, las células cambian su metabolismo y modifican su morfología y, de cara a determinar las condiciones en las que el Compartimento II operará de forma estable, es importante comprobar cuál será el comportamiento de las células de *R. rubrum* cuando la fuente de carbono sea ácido propiónico o ácido butírico.

Así pues, se han realizado experimentos en continuo con estas dos fuentes de carbono, variando la irradiancia incidente y la velocidad de dilución.

4.3.2. Resultados y discusión

Ácido propiónico como fuente de carbono

En experimentos previos en continuo así como en discontinuo (Cornet y Albiol, 2000) se ha observado que la energía radiante requerida por *R. rubrum* para crecer utilizando el ácido propiónico como fuente de carbono es superior a la necesaria cuando la fuente de carbono es ácido acético para la misma velocidad específica. A la

vez, el ácido butírico requiere que el aporte de radiación sea superior comparado con el ácido propiónico. Esto se traduce en que, para la misma irradiancia incidente, la máxima velocidad de dilución a la que el cultivo se mantendrá en condiciones estacionarias, será inferior cuando la fuente de carbono sea ácido propiónico. Y este efecto será aún más acusado cuando la fuente de carbono sea ácido butírico.

Para iniciar los experimentos en continuo utilizando el ácido propiónico como fuente de carbono, se decidió que fuese la aportación de carbono el factor limitante del crecimiento, puesto que se ha observado que es la forma de obtener un crecimiento satisfactorio. Así pues, para obtener una relación irradiancia incidente-concentración de carbono lo más alta posible, se fija una irradiancia incidente cercana al máximo posible para este fotobiorreactor, $7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y una concentración de carbono lo más baja posible, 0.2 g C/L.

En la figura 4.24 se muestra los resultados obtenidos en este primer experimento, en el que la primera velocidad de dilución ensayada es 0.01 h^{-1} . En el estado estacionario obtenido, el peso seco se estabilizó en $0.373 \pm 0.007 \text{ g/L}$ mientras que el carbono residual en el cultivo estaba por debajo del límite de detección del análisis (1 mg C/L). Después de obtener el primer estado estacionario se aumentó la velocidad de dilución, pero debido a problemas operacionales, se tuvo que detener el experimento.

En el siguiente ensayo se continuó con el experimento anterior en las mismas condiciones. Cuando la velocidad de dilución era de 0.015 h^{-1} , el peso seco en el estado estacionario fue de $0.21 \pm 0.1 \text{ g/L}$ y cuando se aumentó la velocidad de dilución a 0.019 h^{-1} , después de transcurrir dos tiempos de residencia, el cultivo se lavó. La fuente de carbono sin consumir presente en el medio de cultivo fue inapreciable.

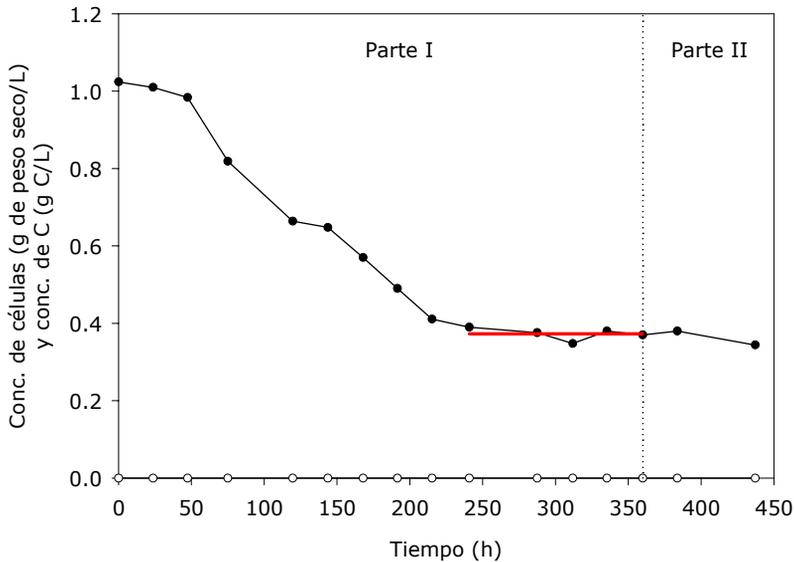


Figura 4.24: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $\psi_0=7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.2 g C/L. Parte I (MC núm. 16): $D=0.01 \text{ h}^{-1}$; Parte II: $D=0.015 \text{ h}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	Parte I
Fuente de carbono	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.01
Tiempo de residencia, τ (h)	100
Número de tiempos de residencia	3.6
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	7430
Peso seco (g/L)	0.373 ± 0.007
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.13: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.24). L.D.: Limite de detección.

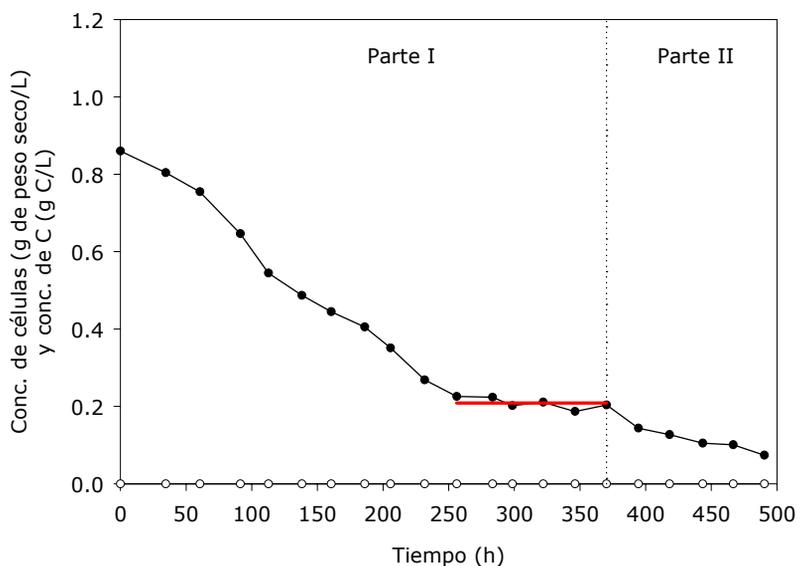


Figura 4.25: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $\psi_0=7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.2 gC/L. Parte I: $D=0.015 \text{ h}^{-1}$; Parte II: $D=0.019 \text{ h}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	Parte I
Fuente de carbono	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, $D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.015
Tiempo de residencia, $\tau \text{ (h)}$	66.7
Número de tiempos de residencia	5.6
Irradiancia incidente, $\psi_0 \text{ (}\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	7430
Peso seco (g/L)	0.21 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.14: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.25). L.D.: Límite de detección.

El hecho de que a una velocidad de dilución de 0.019 h^{-1} la irradiancia incidente del experimento ($7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no sea suficiente para mantener una concentración de células igual o sensiblemente inferior a 0.21 g/L indica que se ha llegado a la velocidad de dilución máxima para este fotobiorreactor, puesto que no es posible

aumentar de forma significativa la radiación aportada ni tampoco se puede bajar la concentración de carbono del medio de entrada, ya que el peso seco del estado estacionario sería tan bajo que la operación sería sumamente inestable.

Llegados a este punto y después de estudiar el montaje experimental, se decidió aumentar la potencia radiante del fotobiorreactor utilizado. Concretamente se duplicó el número de lámparas halógenas del sistema de iluminación, pasando de 15 a 30 s. Este cambio se tradujo en que la irradiancia incidente máxima del nuevo sistema experimental se convirtió en $12880 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, un 55.5% superior a la anterior.

Utilizando ya el montaje experimental con la capacidad de iluminación aumentada, se planearon nuevos experimentos con los que seguir obteniendo más datos sobre el crecimiento de *R. rubrum* sobre ácido propiónico. No obstante, como la finalidad es ir reduciendo progresivamente la relación entre la irradiancia incidente y la concentración de carbono, y, para que los cambios sean menos bruscos, en lugar de aumentar la velocidad de dilución se opta por reducir la irradiancia incidente en el cultivo. Así pues, la velocidad de dilución escogida para esta nueva estrategia es 0.006 h^{-1} , un valor relativamente bajo pero que ofrece suficiente margen para ir bajando el aporte de radiación sin que el cultivo se lave a valores de irradiancia incidente moderados.

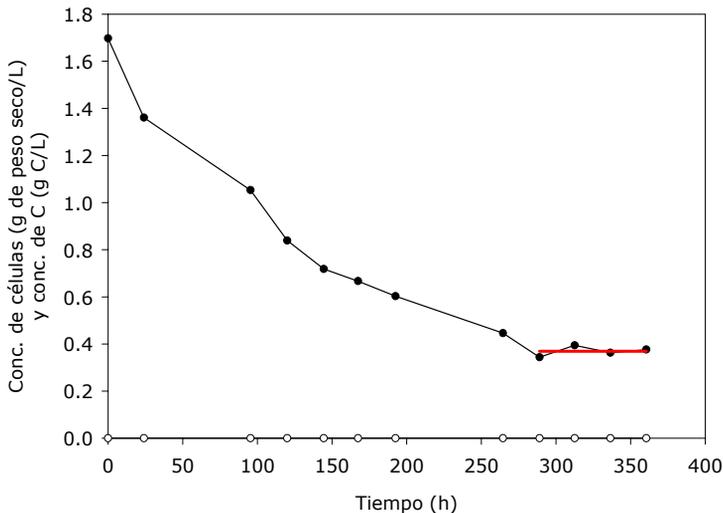


Figura 4.26: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $\psi_0=12880 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.2 g C/L , $D=0.006 \text{ h}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Los dos primeros ensayos (figura 4.26 y figura 4.27) se llevan a cabo utilizando la máxima irradiancia incidente, $12880 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, una concentración de carbono en el medio de entrada de 0.2 g C/L y una velocidad de dilución de 0.006 h^{-1} . El experimento se realizó por duplicado para comprobar la reproducibilidad del mismo.

Condiciones de cultivo	
Fuente de carbono	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, $D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.006
Tiempo de residencia, $\tau \text{ (h)}$	166.7
Número de tiempos de residencia	2.2
Irradiancia incidente, $\psi_0 \text{ (}\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	12880
Peso seco (g/L)	0.37 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.15: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.26). L.D.: Límite de detección.

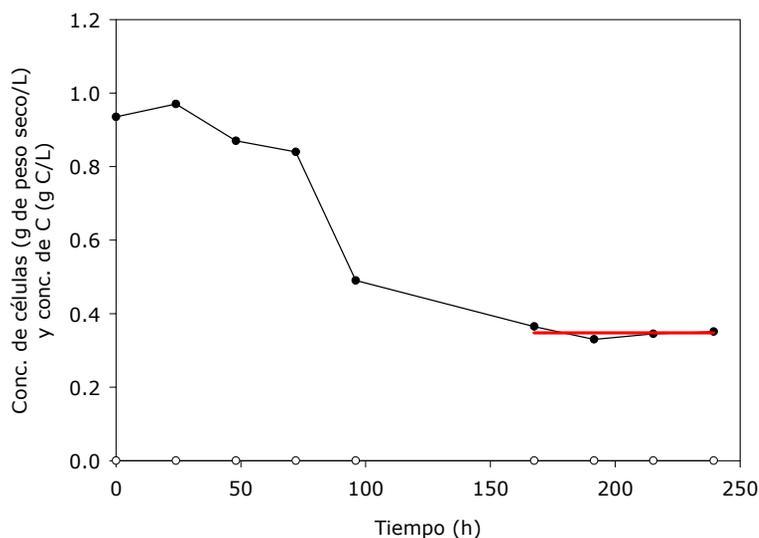


Figura 4.27: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $\psi_0=12880 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 0.2 g C/L , $D=0.006 \text{ h}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

Condiciones de cultivo	
Fuente de carbono	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7
Número de tiempos de residencia	1.5
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	12880
Peso seco (g/L)	0.35 \pm 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.16: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.27). L.D.: Limite de detección.

Con los resultados obtenidos en estos dos últimos ensayos (figura 4.26 y figura 4.27) se corroboran los estados estacionarios obtenidos en los experimentos previos (figura 4.24 y figura 4.25) y confirman que no existe inhibición del crecimiento por exceso de radiación. Además, los resultados del estado estacionario son bastante parecidos en los dos experimentos: 0.37 g/L y 0.35 g/L.

A partir de este punto, se decide ir disminuyendo progresivamente el valor de la irradiancia incidente a la vez que la velocidad de dilución se mantiene constante, con la finalidad de evaluar el comportamiento de las células cuando la relación entre el aporte de radiación y la concentración de carbono va disminuyendo. Los experimentos realizados con ácido acético hacen pensar que se llegará a un punto en que la concentración de carbono se empezará a acumular en el cultivo. Esta acumulación de carbono permitirá observar si se producen cambios metabólicos y morfológicos de las células como se observaba con el ácido acético.

Es muy probable que se observe mejor la zona de transición entre la limitación por carbono a limitación por luz con concentraciones celulares más elevadas. Cuando la fuente de carbono se empieza a acumular, la concentración de células de repente decrece y las medidas experimentales son muy pocos precisas. A concentraciones de células muy bajas, cualquier perturbación en los caudales de líquido logra que el cultivo se lave. Así pues, con el objetivo de aumentar la concentración de células y aprovechando la mayor energía disponible, se decide aumentar la concentración de

carbono en el medio de entrada de 0.2 g C/L a 0.5 g C/L para los siguientes experimentos.

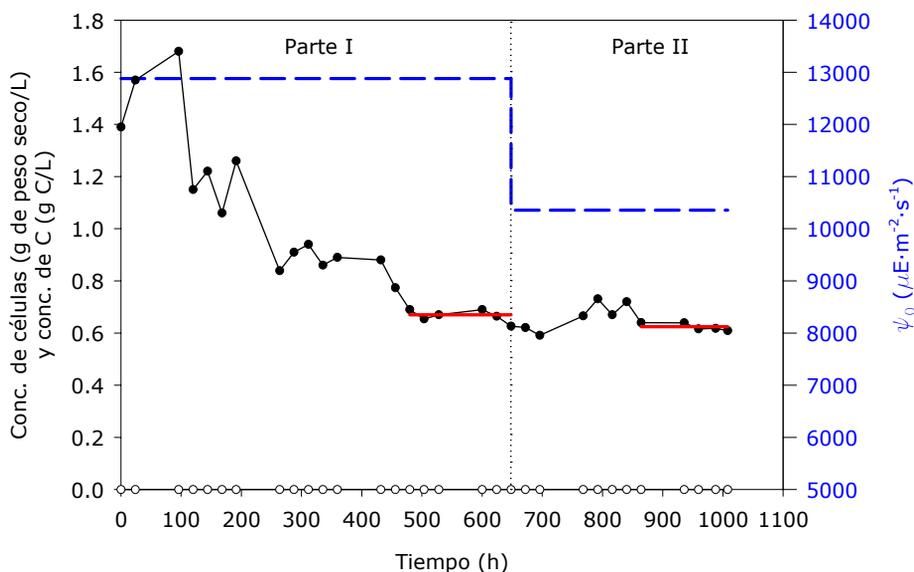


Figura 4.28: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $D=0.006\text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I (MC núm. 17): $\psi_0=12880\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II (MC núm. 18): $\psi_0=10356\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de la concentración de células.

En la figura 4.28 se puede observar que para irradiancias incidentes de $12880\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y $10356\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ es posible consumir toda la fuente de carbono y mantener una concentración de células estable. El hecho de que al reducir el aporte de radiación la concentración de células disminuya confirma que la velocidad específica de crecimiento está gobernada por la energía subministrada y no por la concentración de fuente de carbono.

Con la intención de comprobar las consecuencias de la acumulación de ácido propiónico en el cultivo, se decide continuar disminuyendo la irradiancia incidente hasta que sea la cantidad de radiación la que limite el crecimiento.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. propiónico	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7	166.7
Número de tiempos de residencia	3.9	2.2
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	12880	10356
Peso seco (g/L)	0.67 ± 0.01	0.624 ± 0.006
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.17: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.28). L.D.: Límite de detección.

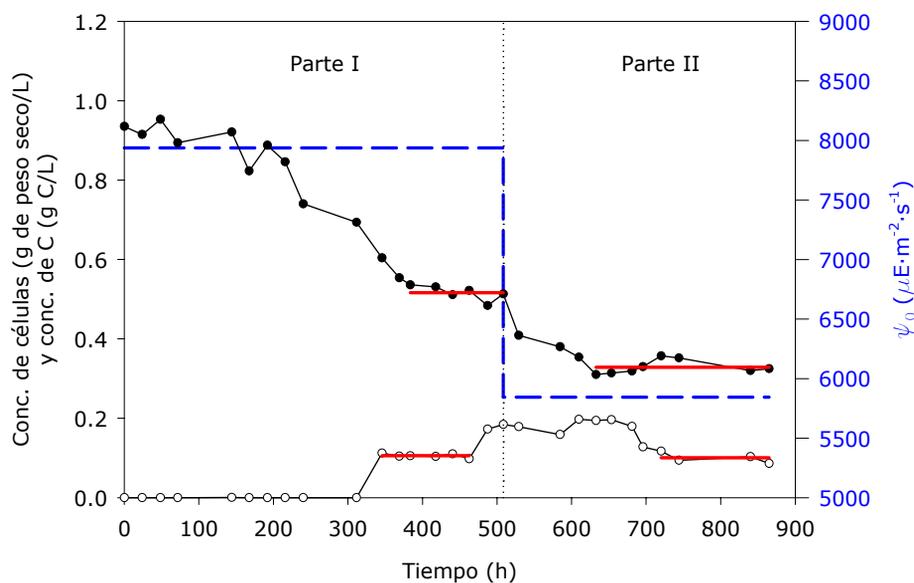


Figura 4.29: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $D=0.006 \text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I (MC núm. 19): $\psi_0=7938 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II (MC núm. 20): $\psi_0=5844 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

El siguiente ensayo se empieza a una irradiancia incidente menor, $7938 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Como se muestra en la figura 4.29, a este valor de aporte de luz el ácido propiónico se empieza a acumular de forma apreciable. No obstante, en ninguno de los dos estados estacionarios se aprecia ningún signo de inestabilidad, como los observados cuando la fuente de carbono era ácido acético.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. propiónico	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7	166.7
Número de tiempos de residencia	3.1	2.1
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	7938	5844
Peso seco (g/L)	0.516 ± 0.008	0.328 ± 0.006
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	0.106 ± 0.002	0.100 ± 0.007

Tabla 4.18: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.29). L.D.: Limite de detección.

Por esta razón, y debido a la importancia de identificar cualquier rango de condiciones en que el cultivo sea inestable, se decide realizar otro ensayo pero a valores de irradiancia incidente aún menores. Así pues, se inicia el cultivo cuyos resultados se presentan en la figura 4.30. En este caso, es especialmente destacable que la concentración de peso seco obtenida después de más de 5 estados estacionarios es considerablemente superior a la obtenida en el experimento precedente y, además, no existe fuente de carbono sin consumir.

En este punto, parece que el sistema exhibe una bifurcación, es decir, el estado estacionario que se obtiene depende del camino seguido para conseguirlo y existe más de un estado estacionario posible para las mismas condiciones de cultivo. Esta hipótesis es coherente con resultados previos obtenidos en este mismo trabajo así como en otros trabajos (Cornet *et al.*, 2003) utilizando ácido acético como fuente de carbono.

Por el contrario, la acumulación de la fuente de carbono podría tratarse de un artefacto de este experimento en concreto. Esta posibilidad será contrastada en los siguientes experimentos.

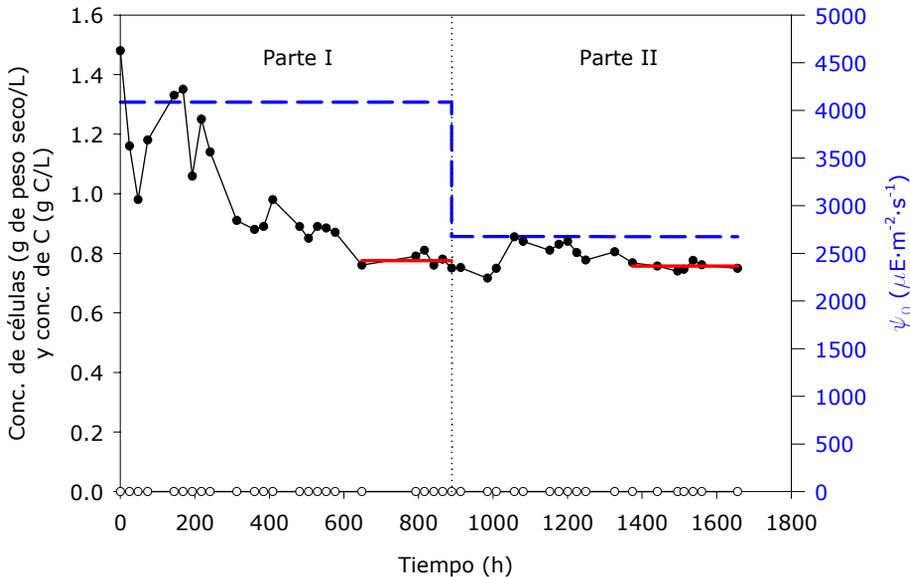


Figura 4.30: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $D=0.006\text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I (MC núm. 21): $\psi_0=4085\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II (MC núm. 22): $\psi_0=2673\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

Al tratarse de una irradiancia incidente suficiente para mantener el cultivo estable a esta velocidad de dilución, se decide volver a reducir el aporte de luz al cultivo.

Tal y como se observa en la figura 4.31, el hecho de que a una irradiancia incidente más baja se mantenga el cultivo en estado estacionario, estable, y con valores de peso seco coherentes con el experimento de la figura 4.30, confirma que en el ensayo de la figura 4.29 no se trata de ningún artefacto y que el estado transitorio es crítico para determinar el estado estacionario final al cual el cultivo llega.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. propiónico	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7	166.7
Número de tiempos de residencia	5.3	4.6
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	4085	2676
Peso seco (g/L)	0.775 ± 0.009	0.757 ± 0.005
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.19: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.30). L.D.: Limite de detección.

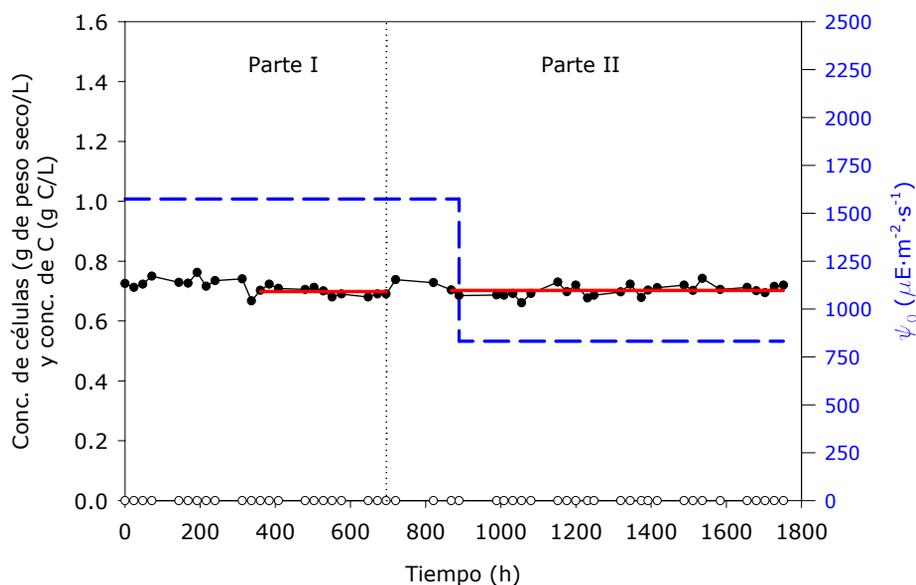


Figura 4.31: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $D=0.006 h^{-1}$ y $0.5 g C/L$. Parte I: $\psi_0=1575 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; Parte II: $\psi_0=832 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. propiónico	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7	166.7
Número de tiempos de residencia	4.2	6.3
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	1575	832
Peso seco (g/L)	0.698 \pm 0.009	0.702 \pm 0.005
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.20: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.31). L.D.: Límite de detección.

Es importante resaltar que en este caso, el experimento es la continuación del estado estacionario anterior (parte II, figura 4.30), es decir, no ha sido necesario volver a inocular el fotobiorreactor y pasar por el preceptivo cultivo en discontinuo. De estos resultados se desprende que incluso a un valor de irradiancia incidente tan bajo como es $832 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, el cultivo se mantiene estable y, a priori, las células consumen la fuente de carbono por completo.

En el mismo experimento, después del segundo estado estacionario, se continua reduciendo de forma escalonada el aporte de luz. En el siguiente cambio (figura 4.32) se sitúa la irradiancia incidente primero en $499 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y después en $354 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En las primeras condiciones el peso seco es capaz de estabilizarse después de un período de oscilaciones, pero cuando se reduce la irradiancia incidente a $354 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ el cultivo acaba lavándose. Así pues, la irradiancia incidente mínima necesaria para mantener un crecimiento de *R. rubrum* creciendo de forma satisfactoria a 0.006 h^{-1} se sitúa entre 354 i $499 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Revisando los resultados de los experimentos realizados en continuo llevados a cabo, se destaca el hecho de que cuando el peso seco desciende después de un cambio de condiciones, la concentración de carbono residual en el medio no aumenta, o al menos, no se detecta. Para analizar este hecho de forma sistemática, se decide estudiar la consistencia de los balances de carbono, el cual se detalla en el apartado 4.3.3 (página 197).

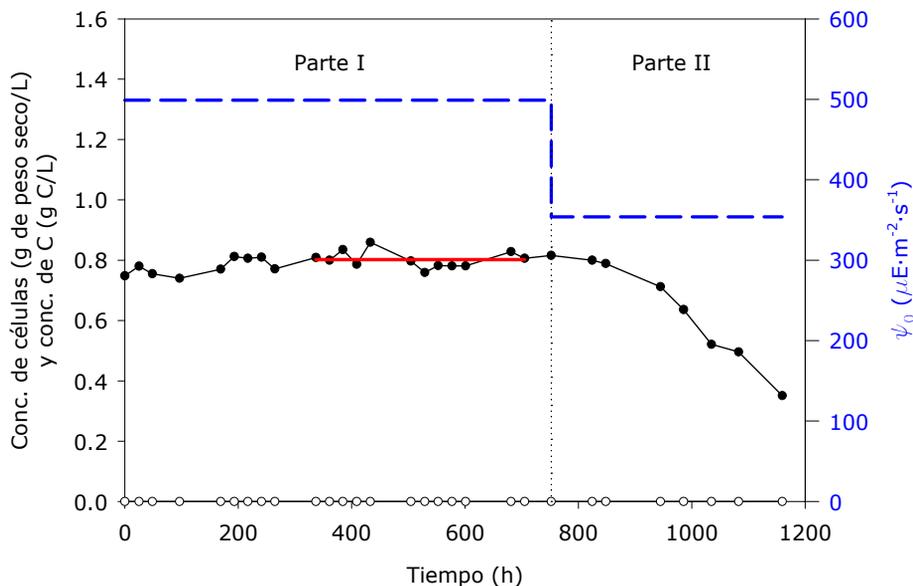


Figura 4.32: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido propiónico como fuente de carbono. $D=0.006\text{ h}^{-1}$ y 0.5 g C/L . Parte I (MC núm. 23): $\psi_0=499\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II: $\psi_0=354\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

Condiciones de cultivo	Parte I
Fuente de carbono	Á. propiónico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.5
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7
Número de tiempos de residencia	4.2
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	499
Peso seco (g/L)	0.80 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.21: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.32). L.D.: Límite de detección.

Como este último experimento en continuo ha durado más de 4800 h (más de 28 tiempos de residencia), a diferentes valores de irradiancia incidente, se puede asegurar que los valores de peso seco obtenidos y el comportamiento del cultivo no son fruto de ningún estado transitorio.

Los resultados de peso seco obtenidos en todos los experimentos en continuo a 0.006 h^{-1} de velocidad de dilución se comparan en la figura 4.33 al representarlos frente la irradiancia incidente que había durante el experimento. Los estados estacionarios que proceden del mismo ensayo en discontinuo inicial están unidos por la misma línea.

El comportamiento de los dos experimentos en continuo es claramente diferente. Uno de ellos exhibe una disminución considerable del peso seco del estado estacionario a la vez que la fuente de carbono no es consumida por completo. El otro experimento muestra un nivel de peso seco más estable, con oscilaciones y no se detecta la acumulación de la fuente de carbono.

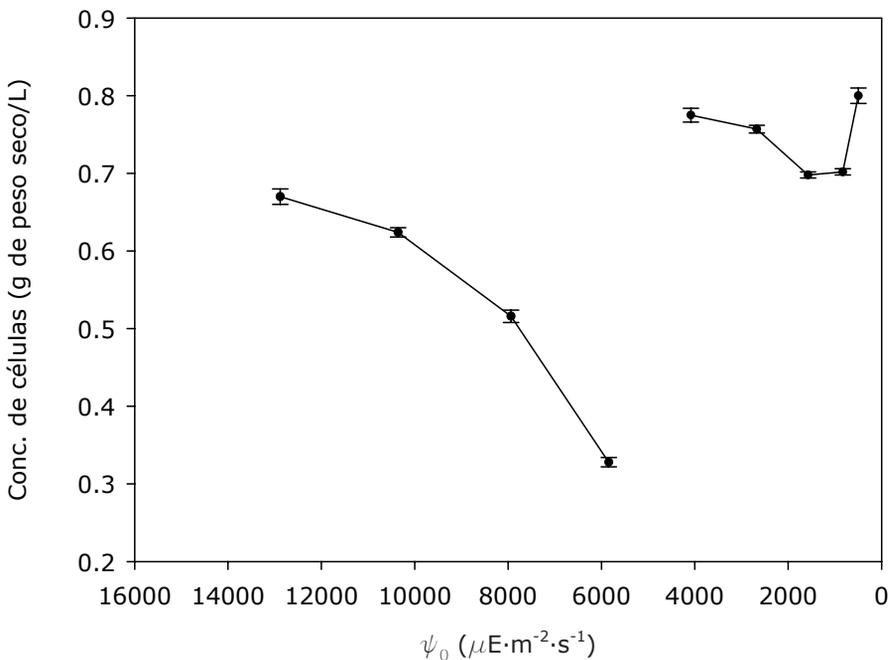


Figura 4.33: Peso seco obtenido en diferentes estados estacionarios, a una velocidad de dilución de 0.006 h^{-1} , en función de la irradiancia incidente del experimento. Cada línea une todos los estados estacionarios obtenidos en continuo derivados del mismo experimento inicial en discontinuo.

Estos resultados sugieren distintas hipótesis, aunque la más probable esté ligada a la relación entre la energía disponible y la fuente de carbono disponible. Si se reduce el aporte de luz y consecuentemente la fuente de carbono se acumula en exceso, las células empiezan a acumular reservas poliméricas de carbono en su interior. En este caso el peso seco aumenta, aunque no a causa del crecimiento real de las células y su división, sino como consecuencia del aumento de masa de las células por la acumulación de polímeros de reserva. Este comportamiento, que ya fue descrito en los experimentos llevados a cabo con ácido acético como fuente de carbono, también ha sido apreciado en los experimentos en los que se ha utilizado ácido propiónico, aunque no representa una amenaza para el funcionamiento del fotobiorreactor como ocurría con el ácido acético, básicamente debido a que el cultivo no se acaba lavando, ya que no se observa que las células se adhieran a la superficie interna del reactor. Probablemente, el efecto de inhibición que produce el ácido acético sobre el crecimiento de *R. rubrum*, sea la razón por la que la acumulación de esta fuente de carbono sea más negativa para la estabilidad del cultivo que la acumulación de ácido propiónico.

El cambio en la morfología de las células, en los experimentos en los que se ha utilizado ácido propiónico como fuente de carbono, se empezó a evidenciar levemente en el estado estacionario de irradiancia incidente $4085 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura 4.30, parte I). Aunque las células no presentaban gránulos intracelulares, empezaron a alargarse sin dividirse, llegando a presentar longitudes equivalentes a más de diez células normales (figura 4.34). En el siguiente decremento del aporte de luz, correspondiente a una irradiancia incidente de $2673 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura 4.30, parte II), ya se podían apreciar agregados celulares de tamaño microscópico, tal y como se puede apreciar en la figura 4.35.

En todos los estados estacionarios posteriores a los de la figura 4.30, la presencia de agregados celulares de tamaño microscópico ha sido constante, aunque sin llegar a adherirse a las paredes del fotobiorreactor. Quizás la diferencia respecto a los experimentos con ácido acético radica en que los primeros, cuando las células cambiaban de morfología, lo hacían prácticamente todas, mientras que en el caso del ácido propiónico, los agregados microscópicos de células coexisten con las células libres que crecen y se dividen de forma normal. Esto explica que las consecuencias del cambio de morfología para el funcionamiento global del cultivo cuando la fuente

de carbono es ácido propiónico no sean tan fatales como cuando se utilizaba el ácido acético.

Retomando la discusión de los resultados mostrados en la figura 4.33, la diferencia básica entre los dos comportamientos observados radica en el hecho de si las células estaban acumulando polímeros de reserva de carbono en su interior. Los valores de peso seco obtenidos en los estados estacionarios con mayor irradiancia incidente (los cuatro primeros puntos de la gráfica) muestran que a medida que disminuye el aporte de luz, y consecuentemente la energía disponible, la concentración de células (y consecuentemente el valor de peso seco) también se reduce para adaptarse y conseguir que la energía disponible por célula sea la mínima necesaria para poder seguir creciendo a esa velocidad específica.

No obstante, una vez que la relación entre el carbono disponible y la energía disponible supera un cierto valor límite, las células detectan que disponen de una fuente de carbono en exceso respecto a la cantidad de luz que les llega y empiezan a acumular gránulos intracelulares de polímeros de reserva. Esto explica que el peso seco obtenido en el estado estacionario sea superior al que en principio se debería esperar para esa irradiancia incidente, ya que al haber variado la masa específica de las células, la relación entre el número de células y el valor de peso seco ha variado.

También se podría intentar explicar el comportamiento observado en la figura 4.33 en base a la eficiencia de la captación de fotones en función de la cantidad de luz a la que están expuestas las células. Podría darse el caso de que los sistemas fotosintéticos de las células de *R. rubrum* se saturasen a elevados valores de irradiancia incidente y, por lo tanto, que operasen ineficientemente. Para poder hacer frente a esta situación, las células podrían modificar los sistemas de recogida de fotones en las membranas internas, por ejemplo, disminuyendo la cantidad de pigmentos que recogen la energía de la luz o variando la duración del proceso de síntesis de pigmentos. Este hecho también se observa cuando se empieza un experimento en continuo, en que las células crecen mejor a valores iniciales bajos de irradiancia incidente. La causa es en que al final del experimento en discontinuo, cuando se pasa a modo continuo, las células están adaptadas a encontrarse en elevada concentración y, por lo tanto, a valores bajos de disponibilidad de luz. No obstante, esta hipótesis no acaba de explicar con éxito la causa de que haya un rango de valores de irradiancia incidente que haga que la relación entre la irradiancia incidente y el peso seco pase por un mínimo.



Figura 4.34: Fotografías mediante microscopía óptica (1000 x) de las células en el estado estacionario de la figura 4.30 Parte I. Se aprecia la existencia de células de longitud mucho mayor a las células normales.

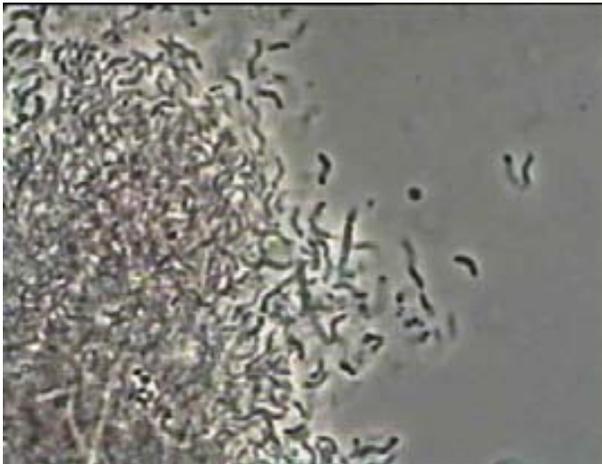


Figura 4.35: Fotografías mediante microscopía óptica (1000 x) de las células en el estado estacionario de la figura 4.30 Parte II.

Por último, otra posibilidad es que el comportamiento de las células en un estado estacionario dependa de la historia previa del cultivo. Si las condiciones previas del cultivo tuviesen un efecto sobre variables internas de las células con elevados tiempos característicos o mostrasen histéresis, podría actuar como un sistema de memoria afectando consecuentemente al comportamiento del cultivo. En estos casos,

obtener exactamente el mismo estado estacionario requiere repetir idénticamente un número de pasos previos.

No obstante, la explicación basada en la relación entre la energía disponible y el carbono disponible parece la más acertada a la vista de los resultados obtenidos.

Ácido butírico como fuente de carbono

Para iniciar una nueva serie de experimentos en modo continuo utilizando el ácido butírico como la única fuente de carbono se decidió empezar con unas condiciones que hiciesen posible la comparación directa de los resultados con los ya obtenidos utilizando ácido propiónico. Así pues, se decidió iniciar los experimentos a la misma concentración de carbono en el medio de entrada (0.2 g C/L) y la misma irradiancia incidente ($7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) que los experimentos realizados con ácido propiónico (figura 4.24 y figura 4.25). Respecto a la velocidad de dilución, se optó por un valor bajo (0.006 h^{-1}) para ir progresivamente incrementándolo, como en los experimentos previos.

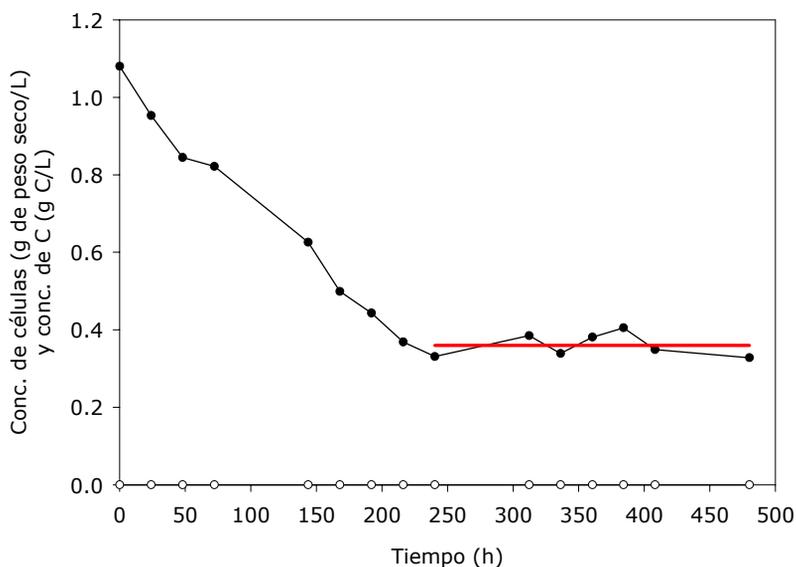


Figura 4.36: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido butírico como fuente de carbono. $D=0.006 \text{ h}^{-1}$, $\psi_0=7430 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.2 g C/L (MC núm. 24). Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

Condiciones de cultivo	
Fuente de carbono	Á. butírico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.006
Tiempo de residencia, τ (h)	166.7
Número de tiempos de residencia	2.9
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	7430
Peso seco (g/L)	0.36 ± 0.01
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.22: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.36). L.D.: Límite de detección.

Una vez comprobado que a esta irradiancia incidente la velocidad de dilución de $0.006 h^{-1}$ permite llegar a un estado estacionario estable, se decide incrementar la velocidad de dilución en el siguiente experimento hasta $0.01 h^{-1}$ (figura 4.37).

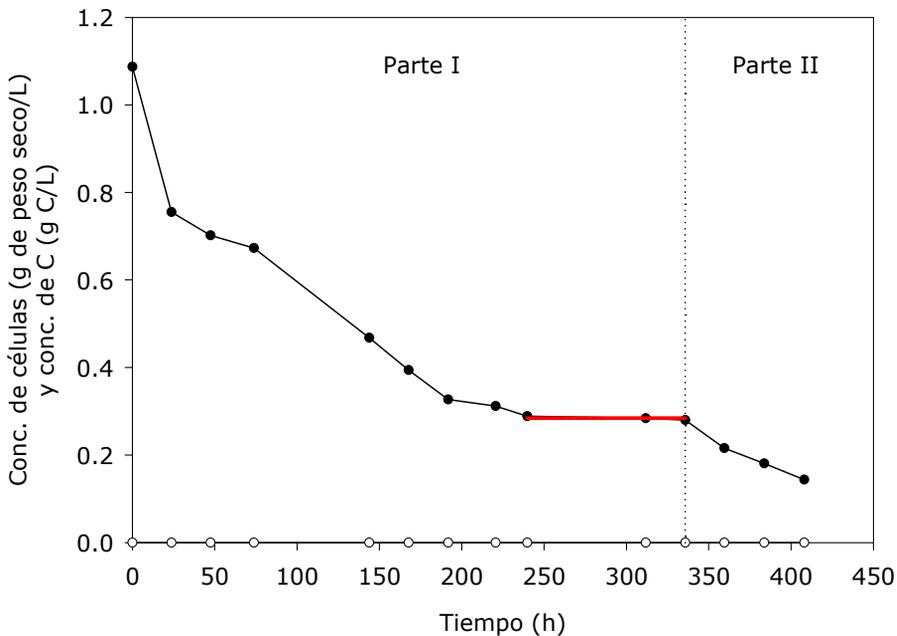


Figura 4.37: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido butírico como fuente de carbono. $\psi_0=7430 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y $0.2 g C/L$. Parte I (MC núm. 25): $D=0.01 h^{-1}$; Parte II: $D=0.015 h^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco o de concentración de carbono.

Condiciones de cultivo	Parte I
Fuente de carbono	Á. butírico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, D (h ⁻¹)	0.01
Tiempo de residencia, τ (h)	90.9
Número de tiempos de residencia	3.7
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	7430
Peso seco (g/L)	0.284±0.003
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.

Tabla 4.23: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.37). L.D.: Limite de detección.

Una vez alcanzado un estado estacionario en las nuevas condiciones (figura 4.37), la velocidad de dilución se vuelve a aumentar ligeramente, hasta un valor de 0.015 h⁻¹. No obstante, con esta nueva velocidad de dilución el cultivo se lava. La explicación más posible es que la irradiancia incidente del experimento sea insuficiente para mantener la nueva velocidad de dilución. Por este motivo, se decidió realizar los siguientes experimentos a valores más elevados de aporte de luz.

El siguiente experimento se lleva a cabo utilizando la máxima irradiancia incidente posible para este fotobiorreactor, 12880 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El resto de condiciones se mantienen constantes respecto al experimento anterior.

Una vez alcanzado el estado estacionario (figura 4.38, parte I), se observa que el peso seco es sensiblemente superior al del experimento precedente, siendo el único cambio en las condiciones el aumento de la irradiancia incidente. Una interpretación posible de este resultado consiste en que el estado estacionario de la figura 4.37 sea el resultado de una colimitación entre la fuente de carbono y el aporte de luz, y es por esto que al incrementar la irradiancia incidente el peso seco aumente también.

Después de este estado estacionario, se aumenta la velocidad de dilución hasta 0.015 h⁻¹, consiguiendo después de más de 170 horas un nuevo estado estacionario, aunque el peso seco acusa una disminución considerable (figura 4.38, parte II). En el siguiente aumento de velocidad de dilución el cultivo se lava, indicando que se ha

llegado a la velocidad de dilución máxima para este fotobiorreactor utilizando ácido butírico.

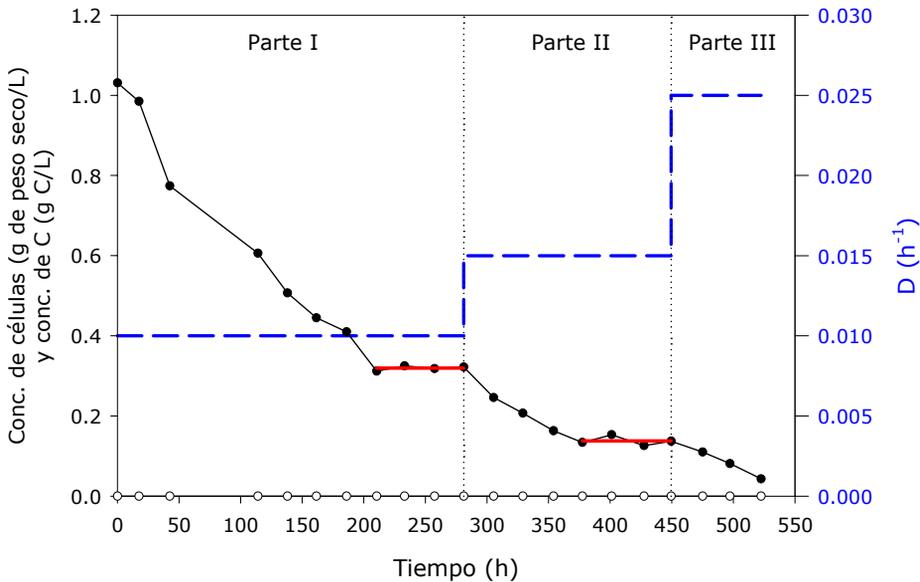


Figura 4.38: Cultivo continuo de *R. rubrum* utilizando ácido butírico como fuente de carbono. $\psi_0=12880 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.2 g C/L. Parte I (MC núm. 26): $D=0.01 \text{ h}^{-1}$; Parte II (MC núm. 27): $D=0.015 \text{ h}^{-1}$; Parte III: $D=0.025 \text{ h}^{-1}$. Línea roja: promedio de valores de peso seco.

Condiciones de cultivo	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Á. butírico	Á. butírico
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2	0.2
Velocidad de dilución, $D \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.01	0.015
Tiempo de residencia, $\tau \text{ (h)}$	100	66.7
Número de tiempos de residencia	2.8	2.5
Irradiancia incidente, $\psi_0 \text{ (}\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$	12880	12880
Peso seco (g/L)	0.319 ± 0.003	0.138 ± 0.006
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	<L.D.	<L.D.

Tabla 4.24: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.38). L.D.: Límite de detección.

En ninguno de estos experimentos en los que se ha utilizado ácido butírico como fuente de carbono se ha apreciado la inclusión de polímeros intracelulares como ocurría cuando era el ácido propiónico la fuente de carbono, aún cuando la relación aporte de carbono-aporte de luz es lo más elevada posible.

Otra apreciación que cabe destacar es el hecho de que tanto en los experimentos en continuo utilizando ácido propiónico como en los que se ha utilizado ácido butírico, se observa que la mayoría de las medidas experimentales de la concentración de carbono en el cultivo durante el estado estacionario han estado por debajo del límite de detección del cromatógrafo de gases. Aunque en un gran número de casos la concentración de carbono residual en el cultivo debiera ser muy pequeña, en otros muchos casos la concentración de fuente de carbono debería ser, como mínimo apreciable. Es el caso evidente de cuando después de un estado estacionario, fruto de un cambio en las condiciones, el cultivo se lava y se observa como extrañamente la concentración de carbono no aumenta.

Para profundizar en esta falta aparente de fuente de carbono, en el próximo apartado se estudia detalladamente los balances de carbono en los experimentos realizados con las tres fuentes de carbono utilizadas.

4.3.3. Balance de carbono

Los balances de carbono indican la consistencia de los resultados obtenidos así como permiten determinar si se conocen todas las formas de carbono que aparecen en el experimento, puesto que el carbono total que entra en el sistema tiene que ser igual a la suma de las salidas del mismo.

Para plantear los balances de carbono, es necesario conocer la composición elemental de las células, la cual depende del contenido macromolecular de las bacterias y, por tanto, de las condiciones de crecimiento y de la velocidad específica de crecimiento. En la tabla 4.37 (página 243) se detallan los resultados experimentales de los análisis de la composición elemental de las células de *R. rubrum* que se han llevado a cabo sobre un amplio número de muestras obtenidas en los diferentes estados estacionarios de los experimentos ya mostrados. A continuación se adelantan los resultados de los análisis de composición elemental, en función de la fuente de carbono del experimento (tabla 4.25 y tabla 4.26).

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Una vez se conoce la composición elemental de la biomasa, se pueden determinar las ecuaciones estequiométricas de crecimiento teniendo en cuenta los elementos que componen las células y sus respectivas fuentes dentro del cultivo, que en estos experimentos son amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico para el nitrógeno, el fósforo y el azufre respectivamente.

Composición elemental de las células (porcentaje másico)						
	C	H	O	N	S	P
Ácido acético	46.02	6.87	29.86	10.28	0.36	1.62
Ácido propiónico	40.78	6.45	36.44	9.45	0.33	1.56
Ácido butírico	38.71	5.92	39.90	8.46	0.22	1.80

Tabla 4.25: Composición elemental media de las células; las cifras son porcentajes en masa. La suma supone el 95% de la composición total de la célula y la diferencia corresponde a las cenizas (sales inorgánicas).

De la tabla 4.25, transformando los porcentajes másicos en porcentajes molares se deduce la composición elemental de las células, la cual se resume en la tabla 4.26.

Fuente de carbono	Composición celular
Ácido acético	$\text{CH}_{1.79}\text{N}_{0.19}\text{O}_{0.49}\text{S}_{0.003}\text{P}_{0.01}$
Ácido propiónico	$\text{CH}_{1.90}\text{N}_{0.20}\text{O}_{0.67}\text{S}_{0.003}\text{P}_{0.02}$
Ácido butírico	$\text{CH}_{1.83}\text{N}_{0.19}\text{O}_{0.77}\text{S}_{0.002}\text{P}_{0.02}$

Tabla 4.26: Composición elemental de las células en función de la fuente de carbono utilizada.

Para determinar los coeficientes estequiométricos de las ecuaciones que describen el crecimiento de las células, se plantean los balances de los elementos C, H, N, S y P y el del grado de reductancia. Generalmente, se sustituye el balance de hidrógeno o bien el de oxígeno por el del grado de reductancia, puesto que no es posible medir experimentalmente la velocidad de aparición o consumo del agua (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Como además, el oxígeno no ha sido medido en la composición de las células y se ha calculado por diferencia, ha sido éste el balance sustituido por el del

grado de reductancia. En la tabla 4.27 se muestra el grado de reductancia de todos los compuestos que intervienen en el crecimiento (Duboc *et al.*, 1995).

Así pues, la ecuación estequiométrica general para el crecimiento de *R. rubrum* en las condiciones de los experimentos mostrados es la siguiente:

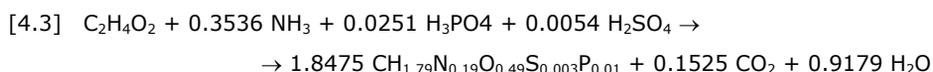
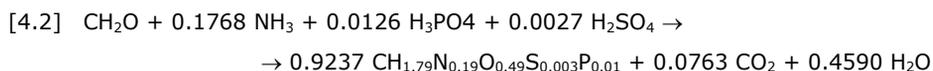


Compuesto	Grado de reductancia (γ)
Ácido acético (CH ₂ O)	4.00
Ácido propiónico (CH ₂ O _{2/3})	4.67
Ácido butírico (CH _{2.25} O _{0.5})	5.25
Amoníaco	0
Ácido fosfórico	0
Ácido sulfúrico	0
Células (acético)	4.33
Células (propiónico)	4.05
Células (butírico)	3.83
Dióxido de carbono	0
Agua	0

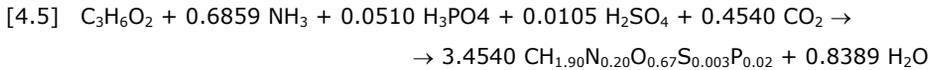
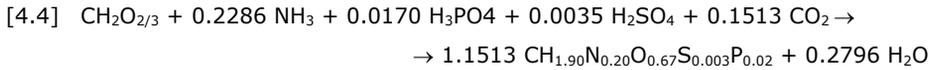
Tabla 4.27: Grado de reductancia de los compuestos que intervienen en las ecuaciones estequiométricas que describen el crecimiento celular (Duboc *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta en la ecuación [4.1] la composición de la fuente de carbono y de las células, se resuelven los balances de C, H, N, S, P y grado de reductancia, obteniendo los siguientes resultados en función de la fuente de carbono:

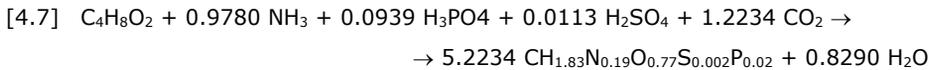
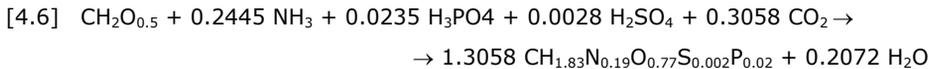
Ácido acético:



Ácido propiónico:



Ácido butírico:



Una vez calculadas las estequiometrías que expresan la conversión de la fuente de carbono en células, se pueden tener en cuenta todas las entradas de carbono al sistema y plantear el balance de carbono, tal y como expresa la ecuación [4.8].

$$[4.8] \quad Q_L C_0 - Q_L X x_c = Q_L C - V \frac{dC}{dt}$$

Donde:

Q_L : caudal de entrada (L/h)

C_0 : Concentración de carbono en la entrada al reactor (g C/L)

X : Concentración de células (peso seco) en el reactor (g peso seco/L)

x_c : Fracción másica de C en las células (g C/g peso seco)

t : tiempo (h)

Como el análisis se restringe a estados estacionarios, es decir, que no hay evolución alguna del sistema respecto al tiempo, el término de acumulación es nulo. Además, como el caudal de entrada es igual al caudal de salida, se pueden dividir todos los términos por el caudal. Realizando estas simplificaciones sobre la ecuación [4.8] se obtiene:

$$[4.9] \quad C_0 - X x_c - C = 0$$

También se debe tener presente el C que puede asimilarse procedente del CO_2 de la fase gas, o bien el carbono que puede salir del sistema porque se esté produciendo

CO₂. Que ocurra una u otra situación depende de la fuente de carbono que utilizan las células para crecer, como se puede apreciar en las ecuaciones estequiométricas [4.3], [4.5] y [4.7].

En la tabla 4.28 se resumen los cálculos y el grado de cierre del balance de carbono para todos los experimentos realizados en continuo.

Fuente de C	Figura	Conc. de células (g PS/L)	Conc. C entrada (g C/L)	Conc. C salida (g C/L)	Conc. C células (g C/L)	C CO ₂ (g C/L)	Ec. [4.9] (g C/L)	Cierre balance (%)
Acét.	4.16-I	1.59	1.0	≈0	0.7702	0.0636	-0.17	83%
Acét.	4.16-II	1.45	1.0	≈0	0.7024	0.0580	-0.24	76%
Acét.	4.20-I	0.83	0.5	≈0	0.4021	0.0332	-0.06	87%
Acét.	4.20-II	0.83	0.5	≈0	0.4021	0.0332	-0.06	87%
Acét.	4.20-III	0.79	0.5	≈0	0.3827	0.0316	-0.09	83%
Acét.	4.21-I	0.79	0.5	≈0	0.3827	0.0316	-0.09	83%
Acét.	4.21-II	0.80	0.5	≈0	0.3875	0.0320	-0.08	84%
Acét.	4.21-III	0.76	0.5	≈0	0.3682	0.0304	-0.10	80%
Prop.	4.24-I	0.373	0.2	≈0	0.1601	-0.0210	-0.06	72%
Prop.	4.25-I	0.21	0.2	≈0	0.0901	-0.0118	-0.12	43%
Prop.	4.26-I	0.37	0.2	≈0	0.1588	-0.0209	-0.06	72%
Prop.	4.27-I	0.35	0.2	≈0	0.1502	-0.0197	-0.07	68%
Prop.	4.28-I	0.67	0.5	≈0	0.2876	-0.0378	-0.25	53%
Prop.	4.28-II	0.624	0.5	≈0	0.2678	-0.0352	-0.27	50%
Prop.	4.29-I	0.516	0.5	0.106	0.2215	-0.0291	-0.20	62%
Prop.	4.29-II	0.328	0.5	0.100	0.1408	-0.0185	-0.28	46%
Prop.	4.30-I	0.775	0.5	≈0	0.3326	-0.0437	-0.21	61%
Prop.	4.30-II	0.757	0.5	≈0	0.3249	-0.0427	-0.22	60%
Prop.	4.31-I	0.698	0.5	≈0	0.2996	-0.0394	-0.24	56%
Prop.	4.31-II	0.702	0.5	≈0	0.3013	-0.0396	-0.24	56%

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Fuente de C	Figura	Conc. de células (g PS/L)	Conc. C entrada (g C/L)	Conc. C salida (g C/L)	Conc. C células (g C/L)	C CO ₂ (g C/L)	Ec. [4.9] (g C/L)	Cierre balance (%)
But.	4.38-I	0.36	0.2	≈0	0.1467	-0.0362	-0.09	62%
But.	4.39-I	0.284	0.2	≈0	0.1157	-0.0285	-0.11	51%
But.	4.40-I	0.319	0.2	≈0	0.1300	-0.0321	-0.10	56%
But.	4.40-II	0.138	0.2	≈0	0.0562	-0.0139	-0.16	26%

Tabla 4.28: Cálculo del balance de carbono en los estados estacionarios obtenidos. Cuando la fuente de carbono es ácido acético, se produce CO₂. Cuando la fuente de carbono es ácido propiónico o butírico, las células incorporan carbono procedente del CO₂ de la fase gas.

A la vista de los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 4.28, se desprende que en la mayoría de los casos el grado de cumplimiento del balance de carbono es considerablemente inferior a los valores mínimos aceptables, que podrían estar situados entorno al 95-98%. Es evidente que hay una fracción de carbono que está saliendo del sistema sin ser detectada, a pesar de no haber detectado ningún compuesto en la corriente de salida del fotobiorreactor en los diferentes análisis que se han realizado en el cromatógrafo de gases y en el HPLC.

En la bibliografía se ha descrito (Storro y McFadden, 1981) la excreción de glicolato por parte de *R. rubrum*, pero no se considera posible que haya ocurrido en estos experimentos puesto que es necesaria la presencia de oxígeno además de ser el CO₂ un inhibidor de este proceso.

Otra posibilidad que cabe contemplar es el hecho de que una fracción de la fuente de carbono presente en el cultivo, ácidos grasos volátiles en todos los casos, se volatilice y abandone el cultivo a través de la fase gas. Esta cuestión se estudia más ampliamente en la siguiente sección.

Volatilización de la fuente de carbono

Con el fin de estudiar la posibilidad de que parte de la fuente de carbono se volatilice del medio de cultivo y se escape a través de la fase gas, se ha planificado y llevado a cabo un experimento en continuo, sin la presencia de células, en la que se ha seguido la concentración del ácido propiónico en el interior del reactor.

Las condiciones del experimento (en cuanto a composición del medio de cultivo, nivel de iluminación, velocidad de dilución, agitación, etc.) han sido similares a las de los experimentos cuyos resultados se expresan en la tabla 4.28 y se resumen en la tabla 4.29.

En la figura 4.39 se representa un esquema del montaje experimental, formado por el fotobiorreactor, un tanque con el medio fresco y otro tanque donde se acumula el medio procedente del fotobiorreactor. De forma similar a los experimentos llevados cabo, el caudal de entrada es el que establece la velocidad de dilución y el caudal de salida, superior al de entrada, es el responsable de mantener el nivel de líquido constante dentro del reactor. En este experimento en concreto, inicialmente el reactor estaba lleno de medio de cultivo exento de fuente de carbono, y a tiempo igual a cero, se pone en marcha el continuo entrando la fuente de carbono con el medio de entrada. No existe un caudal de gas que burbujee en el cultivo, como en los experimentos con células. No obstante, como el caudal de salida es superior al de entrada, para mantener constante el nivel, la corriente de salida está compuesta por intervalos de tiempo en que se extrae líquido del reactor y intervalos en que sólo se extrae gas. Este gas que sale por el tubo del líquido de salida es aire que entra en el fotobiorreactor a través del filtro de aire. Es por esta razón que un aumento en la velocidad de dilución implica un aumento en la velocidad de renovación del gas del espacio de cabecera del reactor.

Condiciones del experimento sin células		
	Parte I	Parte II
Fuente de carbono	Ácido propiónico	Ácido propiónico
Concentración de C	0.2 g C/L	0.2 g C/L
Irradiancia incidente, ψ_0	7938 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	7938 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Velocidad de dilución	0.05 h ⁻¹	0.15 h ⁻¹
Agitación	300 rpm	300 rpm

Tabla 4.29: Condiciones del experimento en continuo llevado a cabo sin células para evaluar la volatilización de la fuente de carbono.

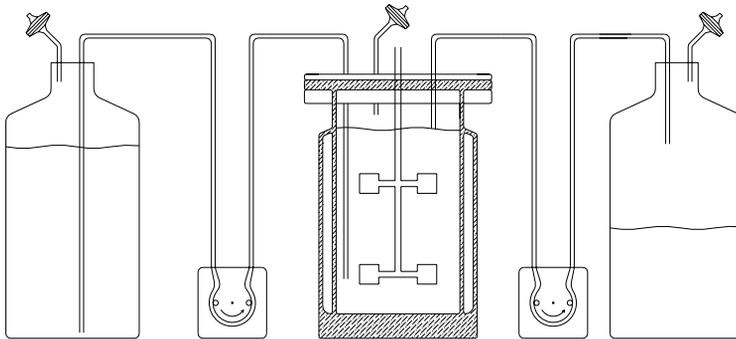


Figura 4.39: Esquema del montaje experimental en el que se ha llevado a cabo el experimento sin células para estudiar la volatilización de la fuente de carbono.

El medio de cultivo utilizado era el mismo que el ya utilizado en los experimentos con células, con una concentración de carbono de 0.2 g C/L siendo la fuente de carbono ácido propiónico. La única diferencia estriba en el incremento de la concentración de NaOH y NaHCO₃, 0.25 mol/L y 0.30 mol/L, respectivamente. Estas sales se añadieron para incrementar la fuerza iónica del cultivo para que ésta fuese similar a la de los cultivos con células, en los que la concentración de sales aumenta respecto a la del medio de entrada por efecto de la adición de álcali del control de pH. En los experimentos con células en que la fuente de carbono era ácido propiónico o ácido butírico, en la solución básica del sistema de control de pH, conjuntamente con la NaOH se añadía NaHCO₃ al cultivo. El NaHCO₃ se añadía puesto que el CO₂ es necesario para el crecimiento de las células con estas fuentes de carbono.

En la figura 4.40 se muestran de color azul las determinaciones de la concentración de carbono frente al tiempo. La curva de color negro, que viene dada por la expresión [4.10], representa el perfil teórico que debería seguir la concentración de carbono si no hubiese ninguna fuga de carbono por la fase gas.

$$[4.10] \quad C = C_0 [1 - \exp(-t D)]$$

Donde:

D: Velocidad de dilución del cultivo (h⁻¹)

Cuando habían transcurrido 530 h (2.65 tiempos de residencia) se aumentó la velocidad de dilución, pasando de 0.05 h⁻¹ a 0.15 h⁻¹, para comprobar la influencia de este parámetro en la volatilización de la fuente de carbono.

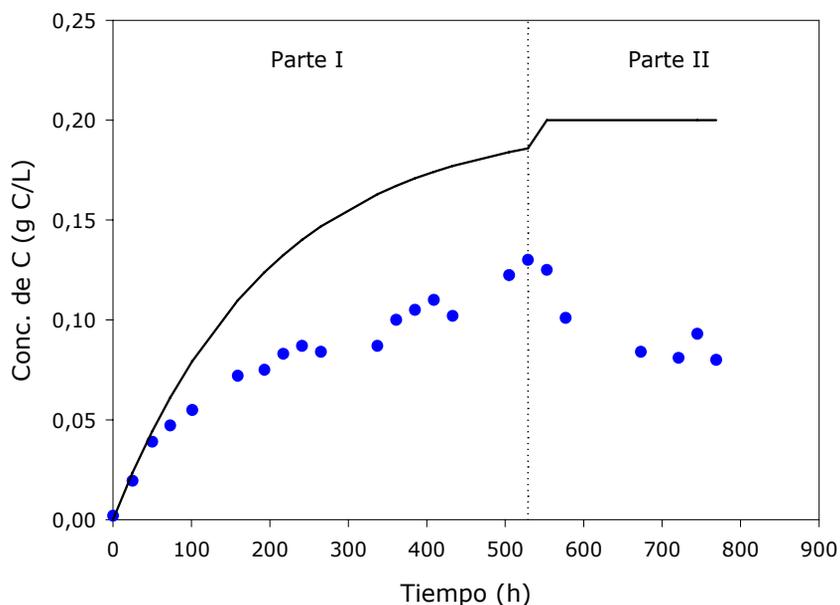


Figura 4.40: Experimento en continuo llevado a cabo sin células para evaluar para estudiar la volatilización de la fuente de carbono. La curva continua corresponde al perfil teórico (ecuación [4.10]).

Observando la gráfica se aprecian claramente dos hechos; en primer lugar, la volatilización del ácido propiónico es considerable y, en segundo término, es notable la contribución de la velocidad de dilución en la velocidad de pérdida de este compuesto.

Para tener en cuenta este fenómeno en los experimentos llevados a cabo con células y comprobar si el balance de carbono se puede cerrar completamente teniendo en cuenta la contribución de la volatilización, es necesario modelizar la transferencia de materia de la fase líquida a la fase gas.

Si en el interior del fotobiorreactor existe transferencia del ácido graso volátil de la fase líquida a la fase gaseosa (como se deduce de la figura 4.40), puesto que la concentración de ácido propiónico en el líquido está en equilibrio con la fase gas del espacio de cabecera, algo similar debe ocurrir en el tanque donde se almacena el medio de entrada al reactor. En el interior de este tanque, también habrá un equilibrio entre el ácido propiónico del líquido con el gas del interior. Además, a medida que el tanque se va vaciando de líquido, aire del exterior entra a través del

filtro de aire para compensar la presión, por lo que disminuye la presión parcial de propiónico del gas del interior y vuelve a favorecer la transferencia de materia.

Las siguientes ecuaciones expresan la evolución de la concentración de carbono en la fase líquida y en la fase gas, tanto en el tanque de medio de entrada como en el fotobiorreactor. Se ha considerado que en el tanque de medio de entrada, el gas del interior está saturado del ácido graso volátil, mientras que en el fotobiorreactor el aire que va circulando a través del espacio de cabecera se va llevando el ácido propiónico volatilizado.

Balances de carbono en el tanque del medio de entrada

$$[4.11] \quad \frac{dV_L}{dt} = -Q_L$$

$$[4.12] \quad \frac{d(C_B \cdot V_L)}{dt} = V_L \frac{dC_B}{dt} + C_B \frac{dV_L}{dt} = -Q_L C_B - \left(\frac{Q_L \gamma P_V x_B 36}{R T} \right)$$

$$[4.13] \quad V_L \frac{dC_B}{dt} = - \frac{Q_L \gamma P_V x_B 36}{R T}$$

Donde:

V_L : volumen de líquido en el interior del tanque del medio de entrada (L)

Q_L : caudal de líquido que entra en el fotobiorreactor (L/h)

C_B : concentración de C en el medio del interior del tanque (g C/L)

γ : coeficiente de actividad del ácido propiónico en la solución: 10.33

P_V : presión de vapor del ácido propiónico en las condiciones del líquido del interior del tanque, a 1 atm de presión y 30 °C: 0.0074 atm

x_B : fracción molar de ácido propiónico en el líquido del interior del tanque: $9.996 \cdot 10^{-5}$

R: constante de los gases ideales: $0.082 \text{ atm} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T: temperatura del líquido del interior del tanque: 30 °C

36: factor de conversión entre g de C y mol de ácido propiónico

El coeficiente de actividad del ácido propiónico en el medio de cultivo se ha calculado como el coeficiente del ácido propiónico puro (a 30 °C y 1 atm) modificado por la contribución de la fuerza iónica del medio de cultivo, según prevé la ley de Debye-Hückel.

La expresión [4.14] es la ley de Debye-Hückel, que depende de la raíz cuadrada de la fuerza iónica de la solución, calculada mediante la expresión [4.15], y del cuadrado de las cargas de los cationes y los aniones.

$$[4.14] \quad -\log \gamma = 0.509 \cdot z_+^2 \cdot z_-^2 \sqrt{I}$$

$$[4.15] \quad I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2$$

Utilizando las ecuaciones [4.14] y [4.15] se obtiene que la contribución de la fuerza iónica aumenta el coeficiente de actividad 5.8 veces. Este efecto, por el cual la volatilidad del ácido propiónico aumenta cuando se incrementa la fuerza iónica de la solución, está documentado ampliamente en la bibliografía (Banat *et al.*, 2002).

Balances de carbono en el fotobiorreactor

$$[4.16] \quad V_R \frac{dC_R}{dt} = Q_L C_B - Q_L C_R - k \left(\frac{\gamma P_V X_{prop}}{P_T} - \frac{P_R}{P_T} \right) \frac{V_G \cdot 36}{RT}$$

$$[4.17] \quad V_G \frac{dP_R}{dt} = -Q_G P_R + k V_G \left(\frac{\gamma P_V X_{prop}}{P_T} - \frac{P_R}{P_T} \right)$$

Donde:

V_R : volumen de líquido en el interior del reactor: 2.4 L

C_R : concentración de C en el interior del reactor (g C/L)

k : coeficiente global de transferencia de materia (h^{-1})

P_R : presión parcial de propiónico en el gas del interior del reactor (atm)

P_T : presión total: 1 atm

V_G : volumen de la fase gas: 0.8 L

El modelo dinámico definido mediante las ecuaciones [4.11]-[4.17] se ha ajustado mediante mínimos cuadrados a los datos experimentales de la figura 4.40. Concretamente, el parámetro que se ha ajustado ha sido el coeficiente de transferencia de materia, siendo los valores óptimos $0.03 h^{-1}$ y $0.40 h^{-1}$ para la parte I y II, respectivamente.

En la figura 4.41 se aprecia que el modelo planteado, con los valores del coeficiente de transferencia de materia obtenidos, describe de forma satisfactoria el perfil de

concentración de fuente de carbono respecto al tiempo, hecho que confirma que la volatilización del ácido propiónico no es despreciable.

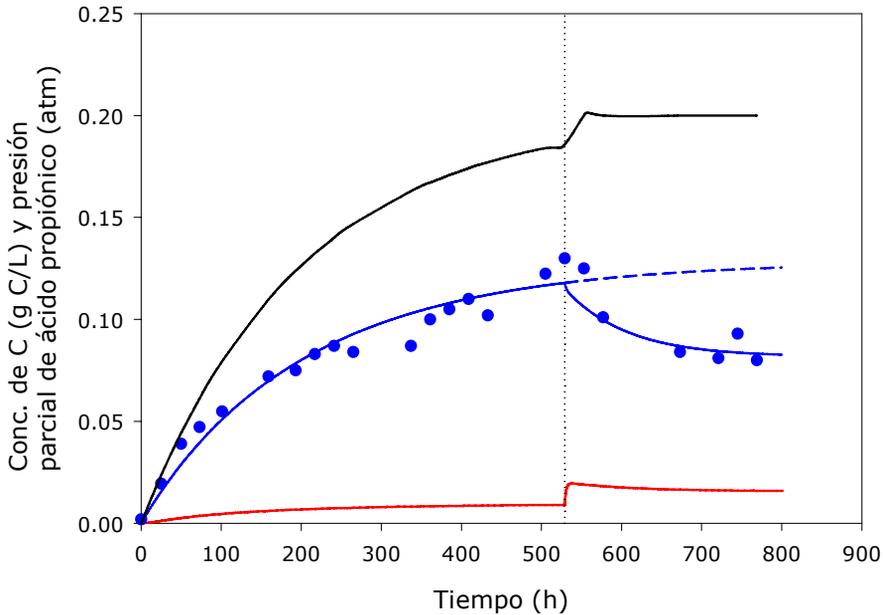


Figura 4.41: Ajuste del modelo que tiene en cuenta la volatilización de la fuente de carbono a los puntos experimentales (curva de color azul). La curva de color negro corresponde al perfil teórico de concentración sin tener en cuenta la volatilización de la fuente de carbono (ecuación [4.10]). La curva de color rojo representa la evolución de la presión parcial de ácido propiónico en la corriente de gas que sale del fotobiorreactor.

Así pues, para saber si la volatilización del ácido graso volátil es la razón por la que no se cumplen los balances de fuente de carbono en los experimentos con células, al modelo ya descrito se le añade la ecuación que describe el crecimiento celular, la expresión [4.18].

$$[4.18] \quad \frac{dX}{dt} = (\mu - D) X$$

Donde:

μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

$$[4.19] \quad \mu = \frac{\mu_m S}{K_S + S}$$

Y además en la ecuación [4.16] se añade el término que expresa el consumo de sustrato por parte de los microorganismos, constituyendo la ecuación [4.20]:

$$[4.20] \quad V_R \frac{dC_R}{dt} = Q_L C_B - Q_L C_R - k \left(\frac{\gamma P_V X_{prop}}{P_T} - \frac{P_R}{P_T} \right) \frac{V_G \cdot 36}{R T} - \frac{\mu_m C_R}{K_S + C_R} \frac{X V_L}{Y_{X/S}}$$

Para comprobar si la pérdida de fuente de carbono posible por volatilización es suficiente para explicar el cumplimiento de los balances de carbono, se ha hecho una simulación del comportamiento cinético del crecimiento celular así como de la evolución de la concentración de carbono tanto en la fase líquida como en la fase gas del cultivo. La simulación corresponde a la resolución simultánea del sistema de ecuaciones formado por las expresiones [4.11], [4.12], [4.13], [4.20], [4.17] y [4.18]. Los cálculos se han realizado utilizando la función de resolución de ecuaciones diferenciales *ode45* (método de Runge-Kutta-Fehlberg, de 4^o-5^o orden y de paso variable) del lenguaje de programación MATLAB (versión 7.0.4.365 -R14- *Service Pack 2*, The MathWorks Inc. 2005).

En la ecuación [4.19], para los parámetros de la velocidad específica máxima de crecimiento y la constante de afinidad se han utilizado los siguientes valores: $\mu_m=0.15 \text{ h}^{-1}$ y $K_S=0.5 \text{ g C/L}$. Aunque no se dispone de valores experimentales para estos parámetros cuando la fuente de carbono es ácido propiónico, los valores utilizados son del orden de magnitud de los reales y se pueden utilizar para este propósito como una primera aproximación.

La velocidad de dilución se ha fijado en 0.05 h^{-1} y la concentración del ácido propiónico en el medio de entrada se ha establecido en 0.2 g C/L , condiciones muy similares a las del experimento representado en la figura 4.26. En cuanto al valor utilizado como rendimiento células-sustrato ($Y_{X/S}$), se ha escogido el valor teórico que se deduce de la ecuación estequiométrica de crecimiento, expresión [4.4], 2.64 g de peso seco/g C.

En la figura 4.42 se representan los perfiles obtenidos en la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales, en la cual se aprecia que cuando se alcanza el estado estacionario, la concentración de carbono en el medio de cultivo (fase líquida) –curva de color azul- es muy bajo, concretamente 0.017 g C/L . En cuanto a la presión parcial de ácido propiónico del gas que abandona el interior del reactor –curva de color verde- se observa que en el estado estacionario el valor también es muy bajo, 0.002

atm. En realidad estos datos son coherentes entre sí, puesto que la presión parcial del ácido graso volátil no puede ser muy elevada en la fase gas, si está en equilibrio con una concentración muy baja de esta especie en la fase líquida.

En la figura 4.43 se ha reducido la escala del eje de ordenadas con la finalidad de poder apreciar mejor la evolución de los perfiles de fuente de carbono en la fase líquida y en la fase gas.

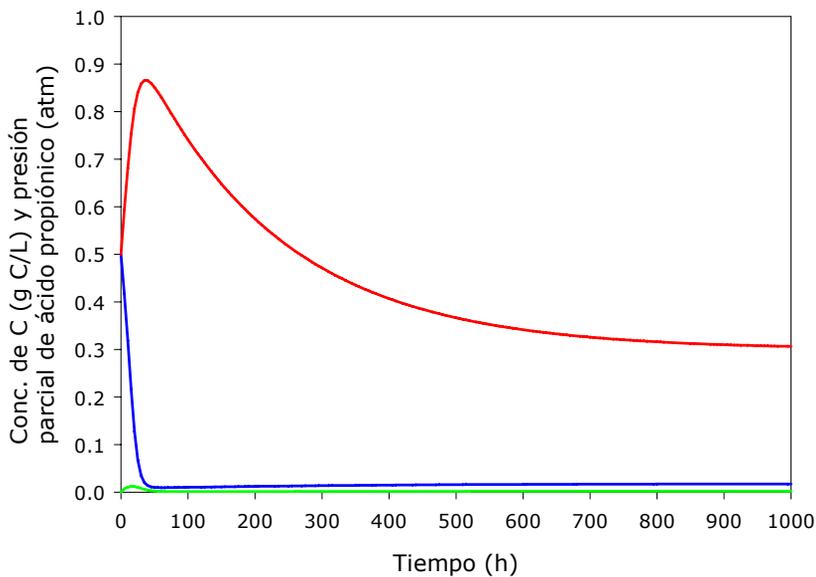


Figura 4.42: Evolución respecto al tiempo de la concentración de células (en rojo), la concentración de ácido propiónico en el medio de cultivo (en azul) y de la presión parcial de ácido propiónico en la fase gas del cultivo (en verde).

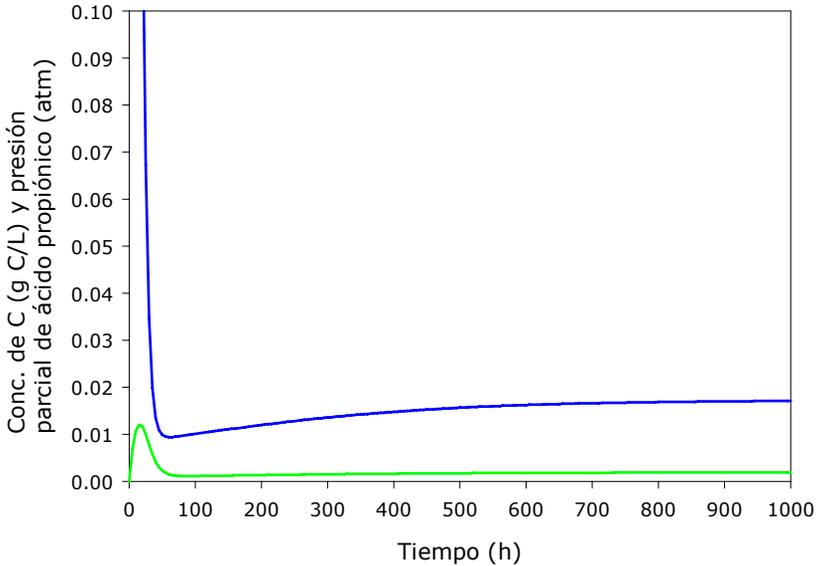


Figura 4.43: Evolución respecto al tiempo de la concentración de ácido propiónico en el medio de cultivo (en azul) y de la presión parcial de ácido propiónico en la fase gas del cultivo (en verde).

Así pues, analizando los resultados obtenidos en esta simulación, se deduce que la cantidad de carbono que se escapa a través de la fase gas debido a la volatilización del ácido propiónico es del orden del 3% del carbono que entra en el sistema en forma de fuente de carbono.

En función de los valores que se utilicen para los parámetros de la ecuación [4.19], la pérdida de fuente de carbono estaría situada entre el 2% y el 5%. Por tanto, aunque la volatilización de la fuente de carbono es una de las causas por la que no se podía cerrar el balance de carbono, a tenor de estos resultados, se observa que no es la única causa.

Crecimiento en condiciones microaerofílicas

Otra de las posibilidades a analizar en los experimentos llevados a cabo está relacionada con la posibilidad de que hubiese entrado en el cultivo cantidades pequeñas de oxígeno. Esto habría hecho que algunas células lo hubiesen consumido, puesto que el oxígeno molecular compite con el proceso de la fotosíntesis a nivel de la cadena respiratoria que comparte alguna parte con la cadena de transferencia de

electrones de la fotosíntesis, y las células hubiesen cambiado su metabolismo de anaeróbico a aeróbico. En estas condiciones, las células de *R. rubrum* oxidan la fuente de carbono de forma completa, produciendo una gran cantidad de CO₂.

Existen estudios en la bibliografía (Grammel *et al.*, 2003) que han estudiado la adaptación fisiológica de las células de *R. rubrum* a condiciones microaerófilas (niveles de pO₂ inferiores al 0.5%), encontrando que en esta situación la bacteria produce niveles máximos de membrana fotosintética.

Para conocer si es posible que se haya podido dar este tipo de metabolismo en los experimentos llevados a cabo, y explicar así el cumplimiento del balance de carbono, por un lado es necesario calcular la cantidad de fuente de carbono que habría sido oxidada de forma aeróbica y, por otro lado, determinar si la cantidad de oxígeno molecular requerido para la oxidación es una cantidad capaz de haber llegado hasta el interior del fotobiorreactor.

Así pues, se considera que la fuente de carbono que no se ha dedicado a la formación de células, ha sido oxidada a CO₂ y agua por parte de células que han seguido un metabolismo aerobio. Una vez determinada esta cantidad de fuente de carbono, se calcula cuál es la cantidad estequiométrica de oxígeno molecular que ha sido consumido, de acuerdo con las ecuaciones estequiométricas [4.21]-[4.23]. Finalmente, teniendo en cuenta el caudal de aire que circulaba a través del espacio de cabecera del fotobiorreactor (diferencia entre el caudal de entrada y el caudal máximo de salida de líquido), se compara la cantidad de oxígeno requerida con la cantidad de oxígeno entrante, teniendo en cuenta que la segunda tiene que ser mayor que la primera puesto que la transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase líquida no es infinita.



A continuación se calcula qué coeficiente global de transferencia de oxígeno (K_La) sería necesario para que pudiese transferirse de la fase gas a la fase líquida la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación. Si el valor del K_La calculado es razonable para el sistema experimental utilizado, podría ser posible la hipótesis del crecimiento de las células en condiciones de microaerofilia.

Fuente de C	C entrada (mol C/L)	C salida (mol C/L)	C CO ₂ (mol C/L)	C celular (mol C/L)	C oxidado (mol C/L)	C oxidado (mol C/h)	O ₂ necesario (mol/h)	O ₂ entrada (mol/h)	O ₂ necesario / O ₂ entrada	k _{1a} (h ⁻¹)
Acét.	0.0833	0	0.0064	0.0642	0.0128	0.0012	0.0012	0.0181	7%	3.7
Acét.	0.0833	0	0.0064	0.0585	0.0184	0.0018	0.0018	0.0181	10%	5.3
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0335	0.0050	0.0010	0.0010	0.0363	3%	2.9
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0335	0.0050	0.0010	0.0010	0.0363	3%	2.9
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0319	0.0066	0.0013	0.0013	0.0363	3%	3.8
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0319	0.0066	0.0019	0.0019	0.0544	3%	5.7
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0323	0.0062	0.0018	0.0018	0.0544	3%	5.4
Acét.	0.0417	0	0.0032	0.0307	0.0078	0.0022	0.0022	0.0544	4%	6.7
Prop.	0.0167	0	0.0025	0.0133	0.0058	0.0001	0.0002	0.0045	4%	0.5
Prop.	0.0167	0	0.0025	0.0075	0.0117	0.0004	0.0005	0.0068	7%	1.5
Prop.	0.0167	0	0.0025	0.0132	0.0060	0.0001	0.0001	0.0027	4%	0.3
Prop.	0.0167	0	0.0025	0.0125	0.0067	0.0001	0.0001	0.0027	4%	0.3
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0240	0.0240	0.0003	0.0004	0.0027	15%	1.2
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0223	0.0257	0.0004	0.0004	0.0027	16%	1.3
Prop.	0.0417	0.0088	0.0063	0.0185	0.0295	0.0004	0.0005	0.0027	18%	1.5
Prop.	0.0417	0.0083	0.0063	0.0117	0.0362	0.0005	0.0006	0.0027	22%	1.8
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0277	0.0203	0.0003	0.0003	0.0027	12%	1.0
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0271	0.0209	0.0003	0.0004	0.0027	13%	1.1
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0250	0.0230	0.0003	0.0004	0.0027	14%	1.2
Prop.	0.0417	0	0.0063	0.0251	0.0229	0.0003	0.0004	0.0027	14%	1.2
But.	0.0167	0	0.0051	0.0122	0.0095	0.0001	0.0002	0.0027	6%	0.5
But.	0.0167	0	0.0051	0.0096	0.0121	0.0003	0.0004	0.0050	8%	1.2
But.	0.0167	0	0.0051	0.0108	0.0109	0.0003	0.0003	0.0045	7%	1.0
But.	0.0167	0	0.0051	0.0047	0.0171	0.0006	0.0008	0.0068	11%	2.3

Tabla 4.30: Cálculo de la cantidad de oxígeno requerido para oxidar estequiométricamente la fuente de carbono no dedicada a la formación de células y la cantidad de oxígeno que puede penetrar en el fotobiorreactor.

En la tabla 4.30 se resumen los cálculos realizados así como los resultados obtenidos. Analizando los resultados expuestos, se aprecia que, en todos los casos, la cantidad de oxígeno molecular que entra dentro del reactor para compensar la diferencia entre los caudales en entrada y salida de líquido, es muy superior a la cantidad de oxígeno necesaria. De hecho, en términos medios, el oxígeno necesario es un 9% del oxígeno que entra. Desde el punto de vista de la transferencia de materia, el coeficiente de transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase líquida necesario es de 2.3 h^{-1} (valor promedio). Este coeficiente no es suficientemente alto como para que el sistema experimental utilizado no lo pudiera alcanzar. Todo esto hace pensar que hay una fracción de la fuente de carbono, que no aparecía en los balances de carbono iniciales, que ha sido catabolizada aeróbicamente y transformada en CO_2 .

Además, muchos de los casos en que no cuadra el balance de carbono se dan cuando disminuye el aporte de luz. Parece que *R. rubrum* pueda complementar una luz insuficiente con el consumo de oxígeno.

4.3.4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en estos experimentos, se pueden destacar varias conclusiones.

La primera conclusión que se extrae de los experimentos realizados con ácido propiónico como fuente de carbono es el hecho de que se requiere una aportación de radiación superior que cuando la fuente de carbono es ácido acético, a igualdad de velocidad de dilución y de concentración de células en el cultivo. Semejantemente ocurre con el ácido butírico respecto al ácido propiónico.

Otra observación importante que se ha hecho consiste en que en todos los experimentos llevados a cabo en continuo, utilizando ácido propiónico y ácido butírico, a medida que se va disminuyendo progresivamente la aportación de luz al cultivo, se observa que al principio la concentración de células en el estado estacionario también disminuye, como también se había apreciado en los experimentos con ácido acético. No obstante, en los cultivos en continuo en que la fuente de carbono ha sido el ácido propiónico, existe un punto de inflexión de esta tendencia, a partir del cual el peso seco aumenta considerablemente. Una de las explicaciones más plausible para este hecho se basa en la acumulación de polímeros

intracelulares de reserva, como así lo confirman los resultados de los análisis de composición macromolecular de las células (ver Apartado 4.5, página 236), cuando la relación entre la luz disponible y el carbono disponible es demasiado baja.

Otra observación que se realiza a tenor de los resultados obtenidos consiste en el hecho que cuando la fuente de carbono es ácido propiónico y se presentan las condiciones ambientales que desencadenan el proceso de acumulación de polímeros intracelulares de reserva, las células no cambian su morfología de forma tan sistemática como lo hacen cuando la fuente de carbono es ácido acético. La consecuencia directa de este hecho es que el funcionamiento del compartimento no se ve tan seriamente comprometido.

Por otro lado, en los experimentos en los que se ha utilizado el ácido butírico como fuente de carbono, no se ha observado en ningún caso la acumulación de gránulos intracelulares por parte de las células, posiblemente porque en los cultivos llevados a cabo la relación entre la luz disponible y el carbono disponible era muy baja.

Una característica común de todos los experimentos llevados a cabo, independientemente de la fuente de carbono utilizada, es que el cumplimiento del balance de carbono no se completa de forma total, siendo la desviación mayor cuando las fuentes de carbono son ácido propiónico y ácido butírico.

Entre las posibles causas de esta pérdida de carbono estudiadas se ha descartado como causa principal la volatilización de la fuente de carbono durante el cultivo en continuo. Aunque se ha demostrado que la volatilización del ácido graso volátil puede llegar a ser considerable en el caso de llegar a concentraciones importantes en el reactor, en el caso de los cultivos en continuo sus niveles son demasiado bajos y su pérdida por este motivo es prácticamente despreciable (entorno al 3%). Otra posibilidad, considerada factible en los experimentos llevados a cabo, reside en que una pequeña entrada de oxígeno molecular en el cultivo sea la responsable de que una fracción de células se encuentre en condiciones de microaerofilia y parte de la fuente de carbono sea catabolizada para producir energía y sea transformada en CO₂ y agua. Dicho fenómeno complementaría la obtención de energía a través de la luz y daría lugar a una drástica disminución del rendimiento biomasa-substrato.

4.4. Adecuación de un fotobiorreactor piloto para el cultivo de *R. rubrum* en condiciones fotoheterotróficas

4.4.1. Introducción

Después de haber realizado numerosos experimentos en un fotobiorreactor a escala laboratorio (2.4 L de volumen útil) en el que se ha ensayado con diferentes fuentes de carbono, diferentes velocidades de dilución y diferentes aportes de luz, se plantea la necesidad de realizar cultivos en un fotobiorreactor diferente, para la obtención de mayores cantidades de biomasa. Para ello se necesitarán fotobiorreactores de tamaño superior, cuya eficiencia debe determinarse en la práctica utilizando reactores de volúmenes mayores. Esta necesidad viene motivada por la distribución heterogénea de la luz dentro del cultivo, haciendo que la disponibilidad de energía por parte de las células varíe en cada punto del cultivo. Esta distribución es función de variables que dependen del cultivo (concentración de células, espectro de absorción de las células, velocidad de dilución, etc.), así como de las características geométricas del fotobiorreactor (fracción de volumen iluminado, radio del volumen iluminado, intensidad de iluminación máxima posible, etc.). Por todas estas razones se hace imprescindible disponer de resultados experimentales en diferentes fotobiorreactores si se desea construir un modelo que prediga el crecimiento de *R. rubrum* en función de la concentración de carbono y de la luz que tenga a su disposición.

También es conveniente que en el cambio de fotobiorreactor se utilicen distintos volúmenes, con la finalidad de ir estudiando los efectos del cambio de escala, a fin de reunir información para el diseño posterior del reactor de la Planta Piloto MELiSSA.

4.4.2. Descripción general del fotobiorreactor

El fotobiorreactor escogido para llevar a cabo los cultivos a escala piloto es un reactor ya existente en el laboratorio de la planta piloto, de tipo «air-lift» y de 7 L de volumen útil, que se había utilizado con anterioridad para realizar experimentos con la microalga *Arthrospira platensis*. Las principales características del cultivo de esta microalga son que las condiciones de crecimiento son aeróbicas, la adición de la

fuente de carbono se hace mediante la introducción de CO₂ gas, el pH óptimo de cultivo es 9.5 y la temperatura óptima 36 °C.

En la figura 4.44 se esquematizan los componentes principales del fotobiorreactor piloto utilizado para el cultivo de *Arthrospira*. Está compuesto por una parte central cilíndrica, de cristal, que permite su iluminación, y una sección de acero inoxidable, que permite la localización de las sondas de medida.

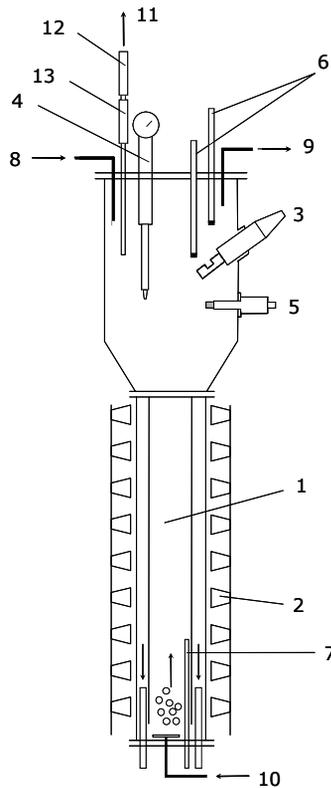


Figura 4.44: Esquema del fotobiorreactor antes de su adaptación para el cultivo de microorganismos fotoheterótrofos. 1: Cilindro de cristal; 2: Soporte de iluminación con lámparas halógenas; 3: Sonda de concentración de células; 4: Sonda de pH; 5: Sonda de pO₂; 6: Sondas de líquido; 7: Sonda de temperatura; 8: Cánula de entrada de líquido; 9: Cánula de salida de líquido; 10: Entrada y dispersión del gas de entrada; 11: Salida de gas; 12: Filtro cerámico de gas; 13: Condensador del gas de salida.

La sección cilíndrica de cristal está compuesta por dos tubos concéntricos, ambos de cristal. El cilindro interior, denominado *riser* es por donde se introduce el gas, a

diferencia de la sección anular externa, llamada *downcomer*, que no tiene entrada de gas. La parte superior de acero inoxidable permite la separación de la fase gas de la fase líquida. La entrada de gas en la sección de flujo ascendente (*riser*) causa una diferencia de densidad en el medio con relación a la sección de flujo descendente (*downcomer*), provocando una corriente ascensional dentro del *riser* mientras el medio desciende a través de la sección de flujo descendente (*downcomer*). Además, el gas proporciona una sobrepresión en la cabecera del reactor, evitando la posible entrada de aire del exterior por las juntas.

El reactor dispone de iluminación periférica a nivel de la sección de cristal mediante 48 lámparas halógenas (SYLVANIA Halogen –Professional de luxe-, 12 V, 20 W, \varnothing 50 mm). Seis fuentes de alimentación de 15 V y 18 A se encargan de proporcionar la energía eléctrica necesaria al conjunto de lámparas. Las lámparas están distribuidas en 6 columnas equidistantes entre sí, de 8 lámparas cada una de ellas. La intensidad de radiación se regula mediante la variación del voltaje suministrado a las lámparas.

El lazo de control de temperatura consta de una sonda de temperatura (Pt-100), un dedo frío por el que circula líquido refrigerante y un baño termostático que mantiene el líquido refrigerante a -15 °C. Cuando el controlador (autónomo) detecta que la temperatura del baño aumenta respecto el valor de consigna (por efecto de las lámparas), abre la electroválvula que permite la circulación del líquido refrigerante por el interior del dedo frío.

4.4.3. Modificaciones necesarias en el fotobiorreactor

Las principales modificaciones necesarias para adaptar el fotobiorreactor al cultivo de *R. rubrum* consisten básicamente en el diseño e implementación de un circuito de gas, que permita la recirculación de los gases, así como el rediseño de los lazos de control para que la operación del fotobiorreactor sea robusta.

Operación en condiciones anaerobias

La modificación más importante consiste en hacer posible que este fotobiorreactor pueda mantener una atmósfera anaerobia durante largos espacios de tiempo.

El circuito de entrada y salida de líquido ha sido implementado mediante la utilización de tubos flexibles de *viton*, que presentan una baja permeabilidad del oxígeno atmosférico.

El circuito de gases del fotobiorreactor tiene que ser cerrado para recircular el gas en su interior. Esta necesidad viene dada por dos motivos importantes. La primera razón está relacionada con el concepto del proyecto MELISSA, que debe ser un sistema cerrado que minimice el intercambio de materia con el exterior. Y el segundo motivo es puramente operacional, puesto que al ser la atmósfera anaerobia, el trabajar con un circuito abierto de gases requeriría el aporte continuo de argón. Este gas noble ha sido el escogido para crear las condiciones anaerobias, puesto que el nitrógeno puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por las células de *R. rubrum* bajo ciertas circunstancias y, además, el argón es más económico que otros gases como el Helio o el Neón. Por tanto, la filosofía de funcionamiento del circuito de gases es que sea cerrado, con recirculación completa del gas y con la introducción de gas externo (argón y/o CO₂) para mantener la sobrepresión en la cabecera del reactor.

En la figura 4.45 se esquematiza el circuito de gas. El gas que sale del reactor por la parte superior se mezcla con CO₂ y/o argón y, mediante un compresor, se vuelve a alimentar al fotobiorreactor. El dióxido de carbono permite, en la puesta en marcha del fotobiorreactor, que las células de *R. rubrum* empiecen a crecer antes, reduciendo la etapa de latencia, y es consumido durante el cultivo en continuo si la fuente de carbono es un ácido graso volátil con grado de reductancia mayor que la biomasa.

Para poder regular el caudal de gas que se introduce en el reactor, como el compresor proporciona un caudal constante, se ha optado por recircular el gas alrededor del compresor, de forma que el caudal excedente que llega al compresor se desvía a la entrada de éste.

La adición de argón es discontinua y se produce cuando el controlador de presión detecta que la presión ha bajado sensiblemente por debajo del punto de consigna (100 mbar). Esta sobrepresión en la cabecera del fotobiorreactor garantiza que no pueda entrar aire del exterior y contamine el cultivo. Asimismo, si el controlador detecta que la presión aumenta por encima de 120 mbar, abre la válvula de seguridad, purgando parte del gas del circuito al exterior.

Una vez montado el circuito y verificado su funcionamiento, se confirma que el consumo de argón es pequeño, aunque no se mide directamente el caudal que entra.

Mediante la conexión de una válvula de tres vías se deja abierta la opción de derivar el gas de dentro del circuito a uno o varios analizadores de gases.

Los depósitos de entrada y salida de medio, así como las botellas de ácido y base del control de pH, están conectadas al circuito de gases. De este modo se garantiza que en todos los puntos del reactor existe una atmósfera anaerobia y no entra oxígeno.

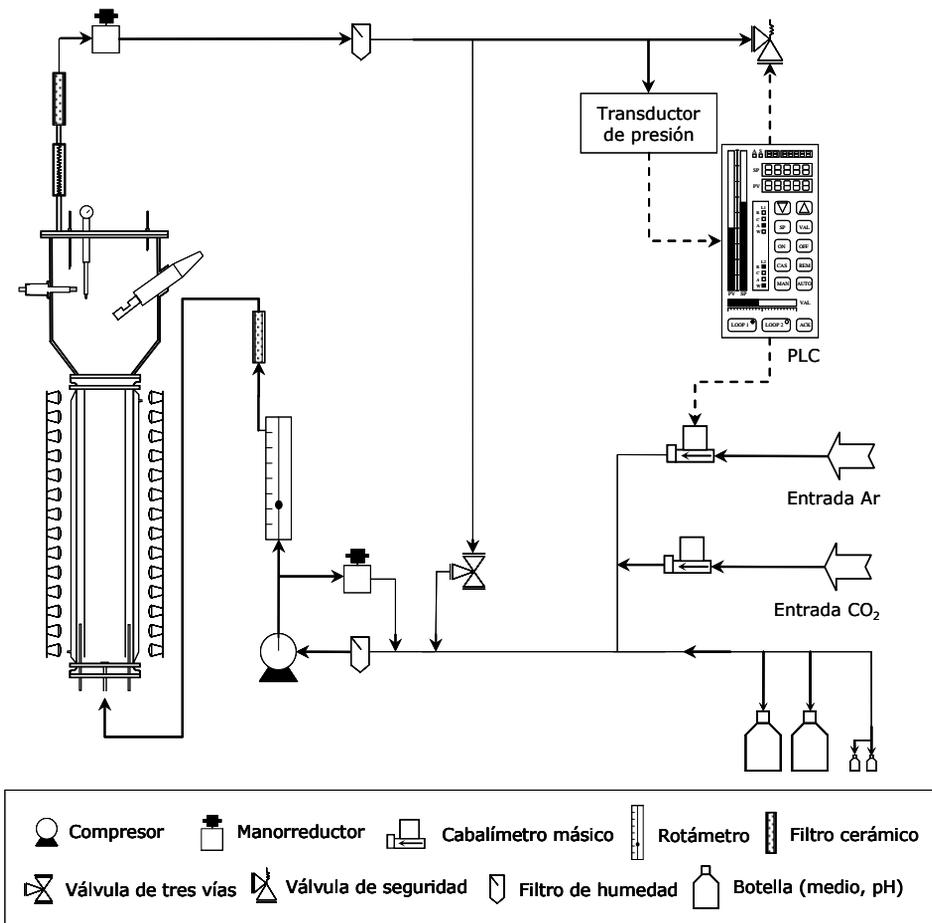


Figura 4.45: Esquema del circuito cerrado de gases implementado para mantener la atmósfera anaerobia.

En la configuración inicial, el medidor de presión estaba conectado a la línea de gases después del filtro cerámico (como se representa en la figura 4.45), para no poder en peligro la esterilidad del reactor. No obstante, se detectaron problemas operacionales consistentes en la pérdida de sensibilidad del sensor de presión por la colmatación del filtro cerámico y se optó por conectar el sensor de presión directamente a la cabecera del fotobiorreactor mediante dos filtros de aire (0.22 μm) colocados en paralelo.

Sistema de control de pH

Para la regulación del pH se opta por la utilización de un controlador externo al PLC (CRISON, pHrocon 18). Éste se encarga de gestionar el funcionamiento de dos bombas peristálticas de ácido y de base en función del valor de pH y de comunicar el valor de este parámetro al PLC, a través de una salida analógica de 4-20 mA.

Mediante la activación de las dos bombas peristálticas, el controlador tiene la capacidad de añadir HCl (1.5 M) o NaOH (1.5 M) para mantener controlado el pH del cultivo. Estas adiciones se hacen en la sección de flujo ascendente del reactor, permitiendo así que el tiempo requerido para su homogeneización sea muy pequeño. El controlador es del tipo todo o nada con una banda muerta. EL punto de consigna es 6.9 y el ancho de la banda muerta de 0.15 unidades de pH para cada lado del punto de consigna.

Regulación de la intensidad de luz

Mediante el lazo de regulación de la intensidad de luz aportada al cultivo, el sistema de control es capaz de suministrar la cantidad de energía radiante deseada. Este lazo de control lo componen el conjunto de lámparas, seis fuentes de alimentación (15 V-18 A), el PLC y, a un nivel superior, la estación de control MCS.

El ordenador de control, en una de sus aplicaciones, contiene la relación entre la salida del controlador (en tanto por ciento) y el valor de la irradiancia incidente suministrada al cultivo. En función de la cantidad de radiación que interesa aportar, el controlador regula la salida analógica que, a su vez, regula las fuentes de alimentación. Así pues la irradiancia incidente suministrada se regula manipulando el voltaje de la corriente suministrada a las lámparas.

Experimentos preliminares con el nuevo fotobiorreactor

Una vez comprobada la capacidad de mantener una atmósfera anaerobia en el fotobiorreactor y de mantener correctamente controladas las condiciones ambientales (pH y temperatura), se decide llevar a cabo experimentos en continuo para verificar el correcto funcionamiento de todos los equipos.

Los primeros obstáculos que aparecieron estuvieron relacionados con el mantenimiento de la esterilidad del fotobiorreactor, aspecto que ha resultado ser muy crítico trabajando con *R. rubrum*. Después de revisar todos los pasos del proceso de esterilización del reactor, que era mediante vapor fluyente, se aseguró que el vapor entrase en contacto con todas las partes destinadas a estar dentro de la zona estéril, dedicando especial atención a los filtros cerámicos y a los estrechamientos y las ranuras interiores de las conducciones, que son zonas a las que el vapor tiene difícil acceso.

En los primeros experimentos que se llevaron a cabo, el cultivo en discontinuo fue satisfactorio. No obstante, cuando se ponía en marcha el continuo, al cabo de un cierto tiempo aparecían agregados de células y el cultivo se acababa lavando. En la figura 4.46 se representa uno de estos experimentos, en la que se observa una primera parte correspondiente al crecimiento en discontinuo y la evolución del cultivo cuando se pone en marcha el modo continuo. Al cabo de aproximadamente 140 horas de haber puesto en marcha el continuo, empiezan a observarse agregados macroscópicos de células en suspensión.

Concretamente, este experimento se llevó a cabo utilizando ácido acético como única fuente de carbono, una concentración de carbono en el medio de cultivo de 0.5 g C/L, una velocidad de dilución de 0.035 h^{-1} , una irradiancia incidente de $1834 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y un caudal de gas de 1 L/min.

Experimentos similares se llevan a cabo variando la concentración de carbono del medio de entrada, la intensidad de la radiación aportada, el caudal de aire que circula a través del cultivo, la velocidad de dilución, la presencia de antiespumante en el cultivo (necesaria para evitar la formación de espumas que dificultaban la normal operación), la presión parcial de CO_2 en el gas del circuito de gases y la concentración de oligoelementos. No obstante, en ninguno de los experimentos se obtiene un comportamiento en modo continuo diferente del mostrado en la figura 4.46.

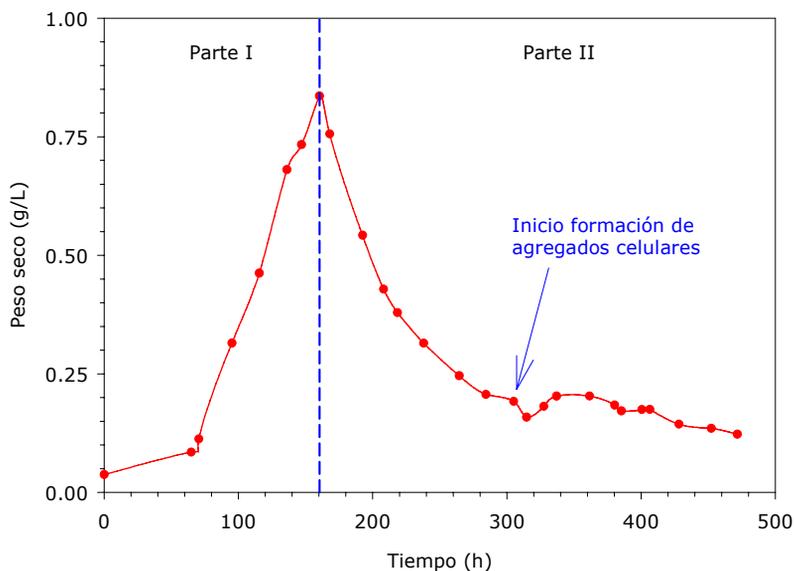


Figura 4.46: Experimento llevado a cabo en el fotobiorreactor piloto utilizando ácido acético como fuente de carbono. Parte I: experimento en discontinuo; Parte II: $D=0.035 \text{ h}^{-1}$, 0.5 g C/L y $\psi_0=1834 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Comparando el fotobiorreactor piloto, en el que ha resultado prácticamente imposible obtener un cultivo continuo con crecimiento satisfactorio de las células, con el fotobiorreactor de escala laboratorio, el cual ha demostrado esta capacidad sobradamente, la diferencia más relevante es el tipo de agitación del cultivo. Mientras en el primer fotobiorreactor la homogeneización del cultivo se consigue mediante la entrada de gas, en el segundo fotobiorreactor la agitación es mecánica.

Para comprobar si el tipo de agitación puede tener algún tipo de efecto en el crecimiento de las células y en la formación de agregados celulares, se decide llevar a cabo un experimento en continuo en el fotobiorreactor a escala de laboratorio en el que se empiece agitando mecánicamente, y cuando el cultivo en continuo esté en condiciones estacionarias, se continúe agitando el cultivo mediante el burbujeo de argón. El resultado de este experimento se representa en la figura 4.47, en la que se aprecia un estado estacionario, a una velocidad de dilución de 0.02 h^{-1} , obtenido agitando el cultivo mecánicamente y, después de hacer el cambio a agitación mediante gas, empiezan a aparecer los primeros agregados de células aproximadamente a las 45 horas del cambio. El cultivo acaba lavándose tal y como se aprecia en la representación.

Este experimento indica que la agitación del cultivo mediante gas lleva a las células a formar agregados celulares macroscópicos, hecho que no ocurre cuando la agitación es mecánica. Este efecto podría producirse por el arrastre del gas de algún componente básico para las células, sin el cual, su crecimiento no se produce de forma satisfactoria. Sería necesario realizar más experimentos para determinar cuáles son las causas que desencadenan este comportamiento del metabolismo celular.

Cabe destacar que en ocasiones, los agregados celulares empiezan a observarse adheridos a la superficie interna del fotobiorreactor, los cuales sirven para que nuevos agregados se adhieran a éstos formando una capa más gruesa de células. No obstante, en otras ocasiones, los agregados celulares formados están en suspensión y después de un cierto tiempo, empiezan a adherirse al cristal del fotobiorreactor. Probablemente, la causa de la diferencia de estos dos comportamientos resida en la relación entre el carbono residual y la aportación de luz, aunque para afirmar categóricamente esta hipótesis se deberían realizar más experimentos.

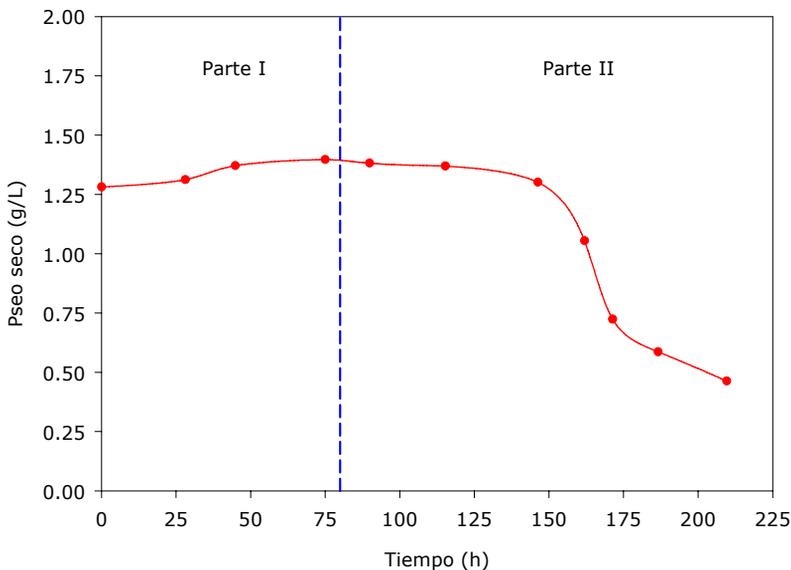


Figura 4.47: Experimento en continuo llevado a cabo en el fotobiorreactor de escala laboratorio. En la Parte I la agitación es mecánica y en la Parte II la agitación es mediante el burbujeo de gas. $D=0.02 \text{ h}^{-1}$.

En la figura 4.48 se puede observar el aspecto que ofrece la parte cilíndrica del reactor cuando las células de *R. rubrum* se adhieren a la pared interna de cristal. Cuando se para el experimento para limpiar el fotobiorreactor, se observa que justo en la posición de delante de las lámparas, las células adheridas mueren, probablemente por exceso de radiación.

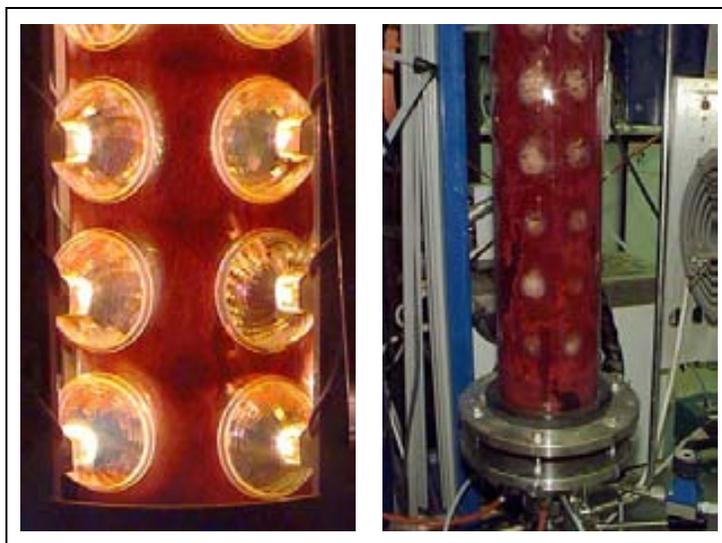


Figura 4.48: Fotografías del fotobiorreactor piloto con las células de *R. rubrum* adheridas a la superficie interna. La primera fotografía está tomada en el cultivo continuo y la segunda cuando se para el cultivo para limpiar el fotobiorreactor.

Aunque ante estos resultados parece que la agitación del cultivo mediante gas es un hecho determinante para que el crecimiento de las células de *R. rubrum* se vea alterado, la ausencia en el reactor piloto de una doble camisa de agua refrigerante puede hacer que se creen gradientes de temperatura en la superficie de cristal, los cuales podrían favorecer la adhesión de las células a la superficie.

Ante los resultados experimentales obtenidos y la sospecha de que los gradientes de temperatura contribuyan a que las células se adhieran con mayor facilidad, se opta por hacer un doble cambio en el reactor piloto, modificando el sistema de agitación y el sistema de intercambio de calor. Por un lado se decide implementar en el fotobiorreactor piloto un sistema de agitación mecánica, que tan buenos resultados ha proporcionado en el reactor de escala laboratorio. Por otro lado, se decide sustituir

la cuba de cristal del reactor por otra que incorpore una doble camisa. El agua que circule por el interior de la camisa cumplirá con un doble objetivo: por un lado mantendrá la temperatura del cultivo controlada y, por el otro, eliminará posibles gradientes de temperatura en el cristal interno del fotobiorreactor.

Sistema de agitación y control de temperatura

Para implementar la agitación mecánica, se diseña un sistema expresamente para este fotobiorreactor, formado por un motorreductor eléctrico de 90 W (400 rpm), un juego de rodamientos, acoplamientos, un cierre mecánico, una fuente de alimentación y un eje de 603 mm de longitud. En el eje se fijaron 5 hélices con un diseño especial para proporcionar al cultivo una agitación con una componente radial (20%) y otra componente axial (80%). En la figura 4.49 se representa el esquema constructivo de las hélices.

Todos los componentes susceptibles de entrar en contacto con el cultivo se construyeron en acero inoxidable AISI-316 mientras que para el resto se utilizó AISI-304.

Para instalar el nuevo sistema de agitación, se hicieron modificaciones en la tapa superior del fotobiorreactor para fijarlo y se eliminó el cilindro de cristal que dividía las secciones de flujo ascendente y descendente. La eliminación de esta pieza comportó que el volumen útil del nuevo fotobiorreactor fuese de 8 L (un litro más que con la configuración original).

Con el nuevo sistema de agitación, la recirculación de gas a través del cultivo no es necesaria, por lo que el circuito de gas queda reducido a la conexión del espacio de cabecera del reactor a la línea de argón, ajustando la consigna a 100 mbar para eliminar riesgos de contaminación.

Con la finalidad de evitar posibles cortocircuitos del medio de cultivo de entrada, es decir, que parte del medio que acaba de entrar salga inmediatamente por la salida, se cambia la entrada del alimento al fotobiorreactor, que estaba situada en la parte superior y se emplaza en la parte inferior de la columna iluminada. Así pues, el medio de cultivo fresco entra por la parte inferior del fotobiorreactor mientras que la salida se sitúa en la parte superior, responsable de mantener el nivel constante en 8 L.

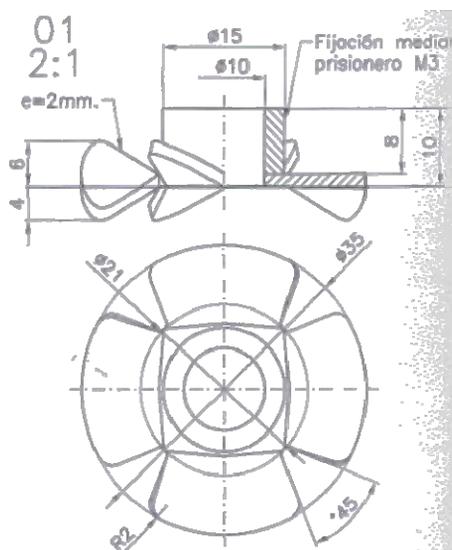


Figura 4.49: Detalle de las hélices fijadas en el eje de agitación. Su diseño permite proporcionar una componente radial (20%) y una componente axial (80%).

No obstante, para asegurarse de que el grado de homogeneización es bueno y que el fotobiorreactor se comporta como un reactor ideal de mezcla completa, se cree necesario realizar un experimento para evaluar la distribución del tiempo de residencia (DTR).

Evaluación de la distribución del tiempo de residencia

Se escoge como trazador el colorante azul dextrano por varias razones. Por un lado, su concentración puede ser seguida fácilmente utilizando un espectrofotómetro. Por otro lado, a valores de pH alrededor de 7, su color medido a 618 nm no varía significativamente en función del valor de pH.

En el capítulo de materiales y métodos (apartado 3.4.1, página 127) se muestra la calibración entre la concentración de azul dextrano y la absorbancia a 618 nm.

Para realizar el experimento, se inyectan en la parte superior del fotobiorreactor 246.5 mL de una solución concentrada de trazador (16.08 g/L) en un breve espacio de tiempo. Durante el experimento, el líquido de salida se va recogiendo en un tanque con la finalidad de integrarlo respecto al tiempo, y así determinar el caudal medio tratado con la máxima precisión. El caudal medio resultante es de 0.171 L/h.

Para encontrar los coeficientes que proporcionan el ajuste óptimo del perfil teórico a los datos experimentales, se ha utilizado el método de mínimos cuadrados con el algoritmo de Marquardt-Levenberg. Suponiendo que el comportamiento hidráulico del fotobiorreactor es como el de un tanque ideal perfectamente mezclado, la ecuación que explica el comportamiento, ya con los coeficientes óptimos, es la siguiente:

$$[4.24] \quad C=0.438 \exp (-0.022 \cdot t)$$

Donde: C: concentración de trazador que sale del fotobiorreactor en función del tiempo, t.

Los datos experimentales de concentración frente al tiempo se representan en la figura 4.50, así como el ajuste óptimo obtenido y que viene dado por la expresión [4.24]. El ajuste de los datos experimentales al perfil teórico de un tanque de mezcla completa es satisfactorio y la diferencia respecto al ajuste es inferior al error experimental.

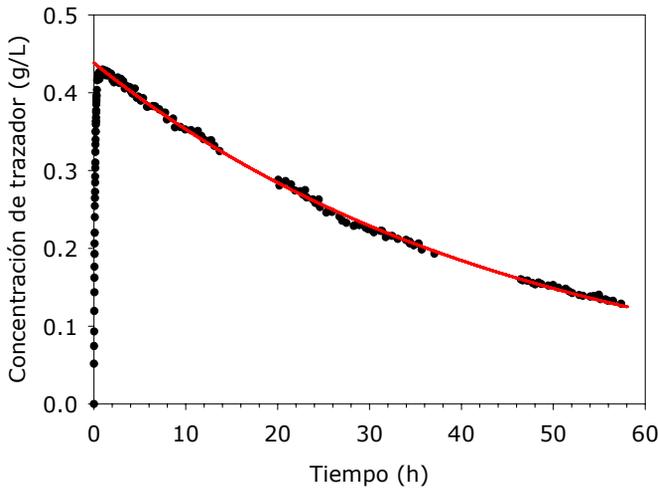


Figura 4.50: Datos experimentales y ajuste teórico en el experimento de la determinación de la distribución del tiempo de residencia.

El tiempo de residencia experimental durante el ensayo ha sido de 46.66 h, mientras que de la curva teórica del ajuste se deduce un tiempo de residencia de 46.21 h, lo que supone un error inferior al 1%. Así pues, a la vista de los resultados obtenidos en la distribución del tiempo de residencia, se puede concluir que el nuevo sistema de agitación mecánica incorporado al fotobiorreactor le confiere a éste un grado de agitación de mezcla perfecta.

La otra modificación importante que se introdujo en el fotobiorreactor está relacionada con el lazo de control de la temperatura del cultivo.

Al sustituir la parte cilíndrica de cristal original por otra, de idénticas dimensiones, pero con una doble camisa externa, se anula el dedo frío que había estado situado en la parte inferior del reactor. La configuración final de este lazo de control queda en que el controlador (de tipo PI) recibe señal de la temperatura del cultivo (mediante una sonda Pt-100) y, en función de la diferencia de temperatura entre el cultivo y la consigna, calcula la nueva consigna de temperatura del baño refrigerante. Este tipo de control resultó ser muy efectivo para oscilaciones de temperatura lentas, como era el caso.

En la figura 4.51 se puede observar un esquema del fotobiorreactor con su configuración final en cuanto al sistema de agitación y al lazo de control de temperatura.

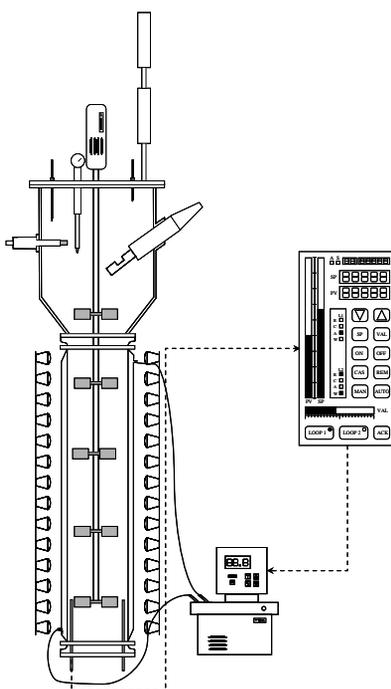


Figura 4.51: Esquema del fotobiorreactor piloto con agitación mecánica y control de la temperatura del cultivo mediante el paso de agua refrigerante a través de una doble camisa de cristal.

4.4.4. Experimentos a escala piloto

Una vez efectuadas las modificaciones previas para que el fotobiorreactor piloto sea adecuado para realizar en él cultivos de *R. rubrum* en continuo, en condiciones estériles y anaerobias y durante largos periodos de tiempo, se diseñan los experimentos a realizar.

Debido a las características geométricas de este fotobiorreactor, el volumen iluminado es el 61.5% del volumen total y, consecuentemente, la aportación de radiación es menor que en el equipo anterior. Este hecho es una característica del aumento de escala, puesto que a medida que el volumen del fotobiorreactor aumenta, más difícil es mantener elevado el porcentaje de volumen iluminado. Hay que tener en cuenta que el volumen no iluminado se comporta de igual modo que el volumen muerto en un reactor químico (en él no se produce reacción química y diluye el aumento de concentración que se produce en el volumen útil).

Teniendo en cuenta estas circunstancias, el primer experimento se efectúa a la máxima irradiancia incidente posible, que en este equipo es de $4474 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. También se utiliza ácido acético como única fuente de carbono, con una concentración en el medio de entrada de 0.4 g C/L, y una velocidad de dilución de 0.04 h^{-1} . En la figura 4.52 se presentan los resultados experimentales y se puede observar como el crecimiento es satisfactorio y el peso seco se estabiliza alrededor de 0.63 g/L. No obstante, cuando se aumenta la velocidad de dilución en un 25% ($D=0.05 \text{ h}^{-1}$), la concentración de ácido acético residual en el cultivo empieza a aumentar a la par que el peso seco a disminuir, hasta que el cultivo se lava como en los experimentos previos.

Una de las hipótesis más plausibles que explicarían el lavado del cultivo es la insuficiente radiación para mantener las células creciendo a una velocidad específica de 0.05 h^{-1} . De ser esto así, la única posibilidad de conseguir estados estacionarios a tasas de diluciones superiores consiste en reducir la concentración de carbono del medio de entrada, así el peso seco del estado estacionario será inferior sin que aumente la fuente de carbono sin consumir y las bacterias dispondrán de más energía por célula.

Así pues, para llevar a cabo el siguiente experimento, se decide utilizar una concentración de ácido acético en el medio de entrada de 0.2 g C/L y empezar por una velocidad de dilución moderadamente baja, para ir aumentando

progresivamente (incrementos de un 20%). Los resultados de este experimento se representan en la figura 4.53.

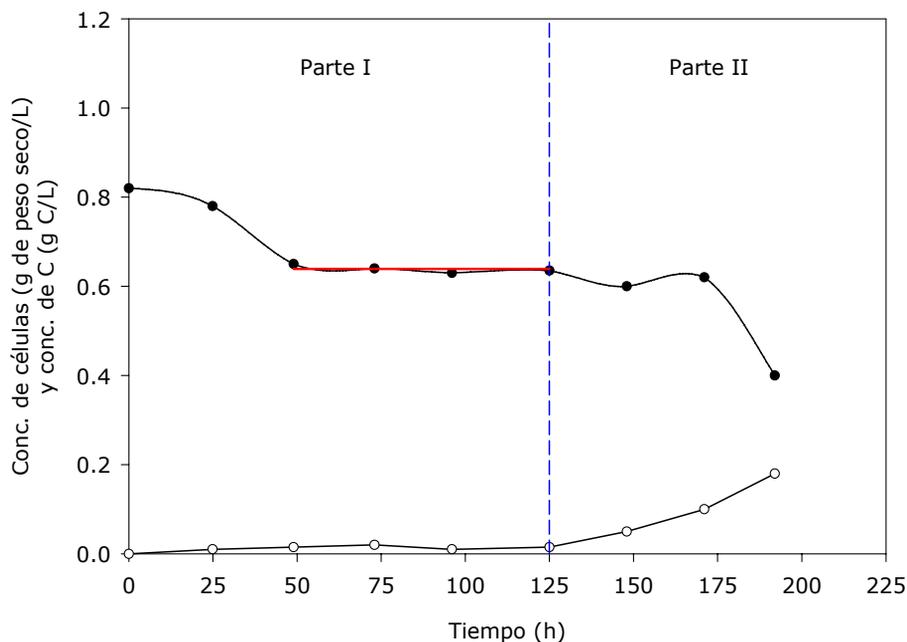


Figura 4.52: Primer cultivo continuo de *R. rubrum* en el fotobiorreactor piloto utilizando ácido acético como fuente de carbono. $\psi_0=4474 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.4 g C/L. Parte I (MC núm. 28): $D=0.04 \text{ h}^{-1}$; Parte II (MC núm. 29): $D=0.05 \text{ h}^{-1}$.

Condiciones de cultivo	Parte I
Fuente de carbono	Á. acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.4
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.04
Tiempo de residencia, τ (h)	25
Número de tiempos de residencia	5.0
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	4474
Peso seco (g/L)	0.639 ± 0.004
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	0.015 ± 0.002

Tabla 4.31: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.52).

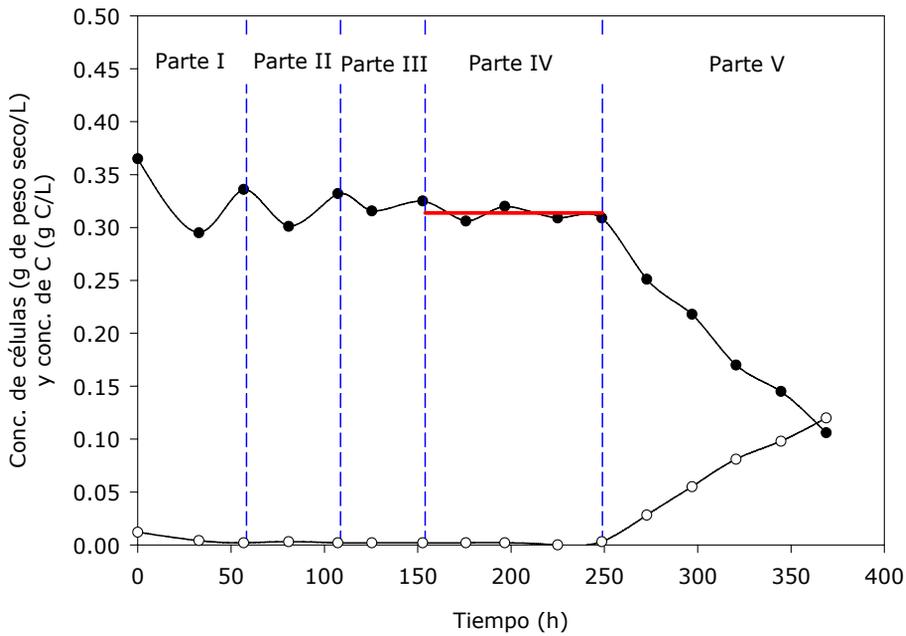


Figura 4.53: Cultivo continuo de *R. rubrum* en el fotobiorreactor piloto utilizando ácido acético como fuente de carbono. $\psi_0=4474 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 0.2 g C/L. Parte I: $D=0.024 \text{ h}^{-1}$; Parte II: $D=0.027 \text{ h}^{-1}$; Parte III: $D=0.035 \text{ h}^{-1}$; Parte IV (MC núm. 30): $D=0.040 \text{ h}^{-1}$; Parte V (MC núm. 31): $D=0.049 \text{ h}^{-1}$.

Condiciones de cultivo	Parte IV
Fuente de carbono	Á. acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.04
Tiempo de residencia, τ (h)	25
Número de tiempos de residencia	3.8
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	4474
Peso seco (g/L)	0.314 ± 0.004
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	0.002 ± 0.001

Tabla 4.32: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.53).

Observando los resultados experimentales representados en la figura 4.53, se observa que la concentración de células se ha mantenido prácticamente estable durante más de 250 horas, mientras la velocidad de dilución se ha ido aumentando paulatinamente. La velocidad de dilución se ha ido aumentando en incrementos aproximados del 20%, siendo éste el aumento discreto más pequeño que se puede hacer con la bomba de entrada.

Cuando la velocidad de dilución se aumenta a 0.049 h^{-1} , las células empiezan a agregarse y, posteriormente, a adherirse a la pared del fotobiorreactor tal y como ya se ha apreciado en experimentos anteriores con otro fotobiorreactor.

La conclusión inicial a la vista de estos resultados consiste que las condiciones de la *Parte V* del experimento son tales que la relación entre la luz disponible y la concentración de carbono disponible es tan baja que hace que se active el metabolismo de acumulación de polímeros de reserva. Para mantener el cultivo creciendo en condiciones satisfactorias y estables a la última velocidad de dilución probada sería necesario un aporte de radiación superior.

Este hecho, también lleva a la conclusión que en este fotobiorreactor, alcanzar un estado estacionario estable a una velocidad de dilución superior a 0.04 h^{-1} , y asegurar al mismo tiempo que la concentración de carbono es el factor limitante del crecimiento (que no se acumule), será muy difícil de conseguir. Tal vez se podría conseguir a concentraciones celulares inferiores (disminuyendo aún más la concentración de carbono del medio de entrada), pero esto presenta numerosos inconvenientes, como el aumento de la inestabilidad del cultivo, necesidad de recoger mayores volúmenes de muestra, necesidad de tiempos superiores para llenar los tubos de muestreo, etc.

En los anteriores experimentos, el valor de irradiancia incidente utilizado ha sido el máximo posible ($4474 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para asegurar que la luz no es el factor limitante del crecimiento. Después de los resultados obtenidos, se puede admitir que para velocidades de dilución hasta 0.04 h^{-1} , los mismos estados estacionarios probablemente podrían haber sido obtenidos utilizando valores de irradiancia incidente menores y todavía asegurar que son condiciones en las que limita el aporte de luz al cultivo. Con la finalidad de verificar esta hipótesis, se planifica realizar un cultivo en continuo a un valor moderado de intensidad de radiación e ir aumentando progresivamente la velocidad de dilución (figura 4.54).

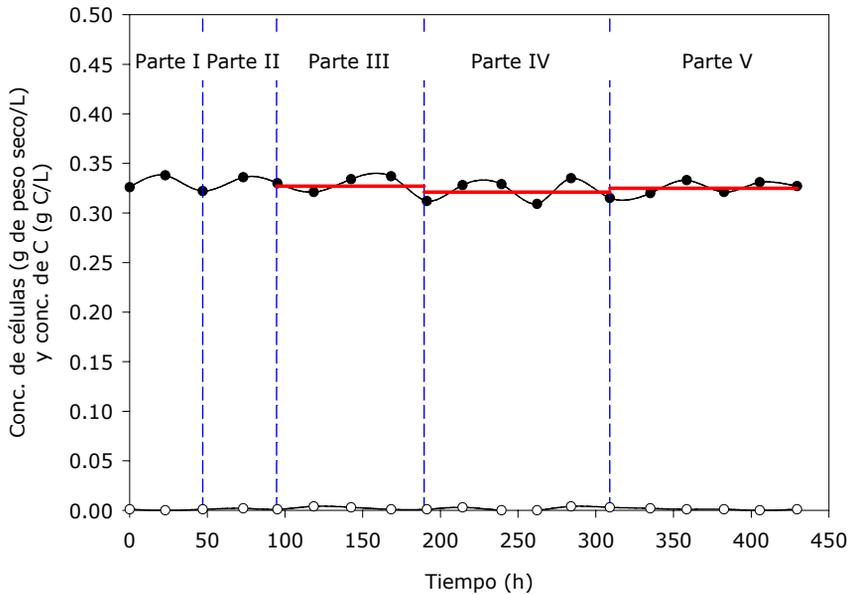


Figura 4.54: Cultivo continuo de *R. rubrum* en el fotobiorreactor piloto utilizando ácido acético como fuente de carbono. 0.2 g C/L. Parte I: $D=0.024 \text{ h}^{-1}$ y $\psi_0=1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte II: $D=0.027 \text{ h}^{-1}$ y $\psi_0=1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte III (MC núm. 32): $D=0.035 \text{ h}^{-1}$ y $\psi_0=1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte IV (MC núm. 33): $D=0.04 \text{ h}^{-1}$ y $\psi_0=1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; Parte V (MC núm. 34): $D=0.04 \text{ h}^{-1}$ y $\psi_0=3788 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Condiciones de cultivo	Parte III	Parte IV	Parte V
Fuente de carbono	Á. acético	Á. acético	Á. acético
Conc. de carbono entrada (g C/L)	0.2	0.2	0.2
Velocidad de dilución, D (h^{-1})	0.035	0.04	0.04
Tiempo de residencia, τ (h)	28.6	25	25
Número de tiempos de residencia	3.4	4.7	4.8
Irradiancia incidente, ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	1256	1256	3788
Peso seco (g/L)	0.327 ± 0.005	0.321 ± 0.005	0.325 ± 0.003
Conc. de carbono cultivo (g C/L)	0.002 ± 0.0006	0.002 ± 0.0007	0.001 ± 0.0005

Tabla 4.33: Condiciones de cultivo y resultados obtenidos (figura 4.54).

Atendiendo a los resultados de la figura 4.54 y de la tabla 4.33, se puede afirmar que los resultados mostrados anteriormente, producidos a valores de irradiancia incidente

elevados, se han obtenido en condiciones de limitación de carbono, puesto que a valores inferiores de irradiancia incidente el carbono aún sigue siendo el factor limitante del crecimiento. Es significativo el hecho de que al aumentar la irradiancia incidente de la *Parte IV* a la *Parte V* del experimento, el peso seco no aumenta significativamente. Esto muestra claramente que el aporte de luz no está controlando el crecimiento a esta velocidad de dilución.

4.4.5. Conclusiones

Una vez llevadas a cabo todas las modificaciones en el fotobiorreactor piloto que se han creído oportunas, para conseguir que sea útil en su utilización en cultivos en condiciones fotoheterotróficas, y verificado su correcto comportamiento mediante experimentos en continuo superiores a 400 h, se puede concluir que la adaptación del equipo ha sido satisfactoria.

Se ha constatado que la agitación mediante gas no es apropiada para el cultivo de *R. rubrum* y que la agitación mecánica constituye una buena alternativa.

Teniendo en cuenta la radiación máxima que se puede aportar al cultivo en este equipo, no se podrán llevar a cabo experimentos en continuo a velocidades de dilución superiores a las ensayadas y descritas en este apartado. Incluso variando la fuente de carbono, no se conseguirá aumentar la productividad específica, ya que a mayor longitud de la cadena carbonatada del ácido graso, mayores son los requerimientos de energía a igual velocidad de dilución.

Se ha estudiado los efectos del aumento de escala. Por ejemplo, en este caso se ha comprobado como al aumentar el volumen del fotobiorreactor, puede ser más difícil aportar energía en forma de luz de forma eficiente si existen restricciones que hagan disminuir el porcentaje del volumen total de reactor que puede ser iluminado. En el momento de diseñar un nuevo fotobiorreactor, las características geométricas así como el volumen susceptible de ser iluminado son factores clave para el equipo.

Se han obtenido datos experimentales en el fotobiorreactor piloto, los cuales serán de especial interés para la construcción de un modelo que describa el crecimiento de *R. rubrum* en función de la concentración de carbono de la entrada, la irradiancia incidente suministrada al cultivo y del conocimiento de las características geométricas del fotobiorreactor.

4.5. Estudio del metabolismo celular en relación a su efecto sobre la estabilidad del cultivo

4.5.1. Introducción

En los experimentos llevados a cabo en continuo en los diferentes fotobiorreactores, se observa en ciertos casos como un cambio en las condiciones de operación produce cambios morfológicos en las células, a menudo irreversibles, con consecuencias drásticas para la estabilidad del cultivo, especialmente cuando la fuente de carbono es ácido acético.

El hecho de que en un momento dado se desencadenen estos cambios morfológicos que acaban comprometiendo seriamente la estabilidad del cultivo y, en consecuencia, la operación del compartimento, hace que esta respuesta celular a un cambio de los factores ambientales deba ser estudiada con detenimiento, dada la importancia que para este reactor y para todo el bucle MELiSSA tiene el hecho de mantener una operación estable y continua, durante largos periodos.

En el presente subcapítulo se realiza un estudio preliminar del metabolismo celular, analizando la influencia de las condiciones de cultivo en la composición de las células, con el objetivo de determinar algunas claves en su comportamiento.

4.5.2. Análisis macromolecular y elemental de las células

En algunos de los estados estacionarios conseguidos en los experimentos en continuo se han recogido muestras de células, las cuales han sido reconcentradas, liofilizadas y guardadas a - 80 °C hasta el análisis de su composición.

Los análisis han consistido en la determinación de las macromoléculas más relevantes que componen las células, así como su composición elemental. Las macromoléculas analizadas han sido proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y polímeros de reserva que se acumulan con más facilidad, como glicógeno, 3- β -hidroxibutirato (PHB) y 3- β -hidroxivalerato (PHV). Los protocolos seguidos en los análisis están detallados en el apartado 3.3, página 114.

Las condiciones de cultivo estudiadas y tomadas como las más determinantes en la composición de las células son: la fuente de carbono, la concentración de carbono en el medio de entrada y en el cultivo, la velocidad de dilución, la irradiancia incidente y la concentración de células en el estado estacionario.

En la tabla 4.34 se resumen las condiciones de cultivo de los casos experimentales analizados, correspondientes a distintos experimentos descritos anteriormente.

Número de muestra	Fuente de carbono	[C] ₀ (g C/L)	[C] (g C/L)	D (h ⁻¹)	ψ ₀ (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	X ⁽¹⁾ (g/L)	[C] ₀ /ψ ₀ (g C·m ² ·s·E ⁻¹ ·L ⁻¹)
1	Acético	1.0	0	0.040	4858	1.61 ± 0.01	205.85
2	Acético	1.0	0	0.040	4858	1.59 ± 0.01	205.85
3	Acético	1.0	0.038	0.040	2229	1.45 ± 0.01	448.63
4	Acético	1.0	Acum.	0.040	1290	1.4-0.6	775.19
5	Acético	0.5	0	0.080	8279	0.83 ± 0.01	60.39
6	Acético	0.5	0	0.080	6486	0.83 ± 0.02	77.09
7	Acético	0.5	0	0.080	4858	0.79 ± 0.01	102.92
8	Acético	0.5	0	0.080	3441	0.80 ± 0.01	145.31
9	Acético	0.5	0	0.080	2266	0.76 ± 0.01	220.65
10	Acético	0.5	0.100	0.080	1290	0.75-0.5	387.60
11	Acético	0.5	0.004	0.120	8279	0.75 ± 0.01	60.39
12	Acético	0.4	0	0.120	8279	0.69 ± 0.02	48.32
13	Acético	0.4	0	0.120	6486	0.73 ± 0.02	61.67
14	Acético	0.4	0	0.120	4858	0.76 ± 0.01	82.34
15	Acético	0.4	Acum.	0.120	3441	0.75-0.4	116.25
16	Propiónico	0.2	0	0.010	7430	0.37 ± 0.01	26.92
17	Propiónico	0.5	0	0.006	12880	0.67 ± 0.01	38.82
18	Propiónico	0.5	0	0.006	10356	0.62 ± 0.01	48.28
19	Propiónico	0.5	0.106	0.006	7938	0.52 ± 0.01	62.99
20	Propiónico	0.5	0.100	0.006	5844	0.33 ± 0.01	85.56
21	Propiónico	0.5	0	0.006	4085	0.78 ± 0.01	122.40
22	Propiónico	0.5	0	0.006	2676	0.76 ± 0.01	186.85
23	Propiónico	0.5	0	0.006	499	0.80 ± 0.01	1002.00

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Número de muestra	Fuente de carbono	[C] ₀ (g C/L)	[C] (g C/L)	D (h ⁻¹)	ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	X ⁽¹⁾ (g/L)	[C] ₀ / ψ_0 (g C·m ² ·s·E ⁻¹ ·L ⁻¹)
24	Butírico	0.2	0	0.006	7430	0.36 ± 0.01	26.92
25	Butírico	0.2	0	0.010	7430	0.28 ± 0.01	26.92
26	Butírico	0.2	0.000	0.010	12880	0.32 ± 0.01	15.53
27	Butírico	0.2	0.000	0.015	12880	0.14 ± 0.01	15.53
28	Acético	0.4	0.015	0.040	4474	0.64 ± 0.01	89.41
29	Acético	0.4	acum	0.050	4474	0.6-0.4	89.41
30	Acético	0.2	0.002	0.040	4474	0.31 ± 0.01	44.70
31	Acético	0.2	acum	0.049	4474	0.3-0.1	44.70
32	Acético	0.2	0.002	0.035	1256	0.33 ± 0.01	159.24
33	Acético	0.2	0.002	0.040	1256	0.32 ± 0.01	159.24
34	Acético	0.2	0.001	0.040	3788	0.33 ± 0.01	52.80

Tabla 4.34: Resumen de las condiciones de cultivo de las diferentes experimentos analizados. [C]₀: concentración de carbono; [C]: concentración de carbono en el cultivo; D: velocidad de dilución; ψ_0 : irradiancia incidente; X: concentración de células en el cultivo; Acum.: Situación en la que el sustrato se acumula y no hay una concentración constante. ⁽¹⁾ Cuando existe un único valor de concentración de células, éste corresponde a un estado estacionario. Por el contrario, cuando aparece un rango de concentraciones, se hace referencia a una situación no estable.

En la tabla 4.35 y en la tabla 4.36 se detallan los resultados experimentales obtenidos en los análisis de los macrocomponentes celulares, así como el error estándar asociado a la determinación.

En la tabla 4.37 se recogen los resultados obtenidos en el análisis elemental de las muestras de células. Los elementos analizados son C, H, N, S y P (sólo muestras 15-34). El oxígeno deberá ser calculado por diferencia teniendo en cuenta que las cenizas están entorno al 5% del peso de la célula (Albiol, 1994). El contenido de H, N, S y P está referido al contenido de C en peso.

Número de muestra	Cont. de proteínas (%) ± EE	Cont. de lípidos (%) ± EE	Cont. de RNA (%) ± EE	Cont. de DNA (%) ± EE
1	64.23 ± 3.24	6.55 ± 0.11	5.37 ± 0.69	2.26 ± 0.49
2	60.35 ± 1.60	6.05 ± 0.31	2.95 ± 0.32	4.45 ± 1.36
3	60.74 ± 1.09	7.48 ± 0.09	3.96 ± 1.15	3.19 ± 0.14
4	58.24 ± 1.18	6.87 ± 0.17	4.84 ± 0.83	3.06 ± 0.67
5	66.59 ± 9.84	5.39 ± 0.76	7.34 ± 0.71	4.04 ± 0.46
6	63.67 ± 7.14	5.71 ± 0.92	9.45 ± 0.61	3.07 ± 0.04
7	63.65 ± 3.63	4.95 ± 2.92	10.56 ± 1.41	3.73 ± 0.80
8	63.18 ± 2.74	5.47 ± 3.02	5.57 ± 0.63	5.31 ± 0.36
9	55.32 ± 2.95	5.63 ± 1.53	2.09 ± 0.47	3.99 ± 0.63
10	59.19 ± 5.29	6.64 ± 0.41	1.86 ± 0.25	1.72 ± 0.12
11	64.17 ± 1.72	5.23 ± 2.96	2.06 ± 0.08	2.29 ± 0.30
12	64.22 ± 3.67	4.97 ± 1.05	4.10 ± 0.08	3.15 ± 0.19
13	58.54 ± 7.66	4.65 ± 1.07	5.75 ± 0.43	2.33 ± 0.36
14	63.89 ± 6.09	5.77 ± 0.72	2.97 ± 0.17	1.17 ± 0.04
15	51.72 ± 2.52	5.58 ± 0.86	6.25 ± 0.29	2.26 ± 0.49
16	62.80 ± 1.65		2.90 ± 0.14	0.35 ± 0.14
17	65.88 ± 1.69	3.98 ± 0.11	6.35 ± 0.18	0.70 ± 0.19
18	65.06 ± 1.17	2.15 ± 0.16	6.65 ± 1.37	0.93 ± 0.38
19	64.44 ± 0.09	1.17 ± 0.81	3.26 ± 0.84	0.33 ± 0.14
20	63.86 ± 1.56	0.46 ± 1.53	5.10 ± 0.12	2.08 ± 0.85
21	60.28 ± 1.40	1.17 ± 0.59	7.91 ± 0.05	1.31 ± 0.58
22	60.44 ± 1.44	4.97 ± 0.11	6.78 ± 0.06	2.33 ± 1.04
23	61.05 ± 2.53	3.72 ± 0.91	5.45 ± 0.36	2.11 ± 0.46
24	64.58 ± 0.42		4.19 ± 0.23	1.69 ± 0.75
25	66.83 ± 1.50	1.80 ± 0.68	5.46 ± 0.11	0.79 ± 0.32
26	64.22 ± 1.90		4.72 ± 0.15	2.39 ± 0.97
27	64.36 ± 2.57	0.65 ± 0.80	6.08 ± 0.08	0.93 ± 0.38
28	60.04 ± 1.65	7.19 ± 0.42	4.62 ± 0.26	1.95 ± 0.04
29	63.28 ± 1.16	7.92 ± 0.44	4.88 ± 0.19	1.14 ± 0.69
30	62.94 ± 1.28	6.59 ± 0.26	5.29 ± 0.20	2.27 ± 0.52

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Número de muestra	Cont. de proteínas (%) ± EE	Cont. de lípidos (%) ± EE	Cont. de RNA (%) ± EE	Cont. de DNA (%) ± EE
31	58.85 ± 1.27	8.91 ± 0.31	4.11 ± 0.23	1.90 ± 0.67
32	64.78 ± 1.92	6.42 ± 0.18	6.71 ± 0.66	3.55 ± 0.40
33	60.48 ± 2.74	6.28 ± 0.20	5.36 ± 0.34	2.96 ± 0.29
34	67.52 ± 4.12	1.12 ± 0.83	3.40 ± 2.40	0.96 ± 0.39

Tabla 4.35: Contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en las células para cada uno de los experimentos analizados, expresado en porcentaje másico. EE: error estándar.

Número de muestra	Contenido de PHB (%) ± EE	Contenido de PHV (%) ± EE	Cont. de carbohid. (%) ± EE	Cont. de glicógeno (%) ± EE
1	8.61 ± 0.41	--	8.20 ± 0.93	2.03 ± 0.02
2	1.98 ± 0.35	--	8.05 ± 1.01	2.84 ± 0.10
3	9.87 ± 0.34	--	7.62 ± 0.37	2.54 ± 0.17
4	19.09 ± 0.85	--	12.99 ± 2.45	2.28 ± 0.17
5	5.46 ± 0.11	--	8.81 ± 0.94	1.86 ± 0.14
6	6.62 ± 0.18	--	7.87 ± 0.99	2.24 ± 0.34
7	6.47 ± 0.68	--	8.42 ± 1.81	2.59 ± 0.15
8	6.53 ± 0.39	--	8.16 ± 2.85	2.89 ± 0.19
9	3.91 ± 0.64	--	8.99 ± 1.97	2.48 ± 0.49
10	7.36 ± 0.45	--	8.97 ± 0.51	2.90 ± 0.16
11	7.55 ± 0.56	--	9.67 ± 1.41	2.60 ± 0.11
12	3.41 ± 0.29	--	8.42 ± 1.12	1.64 ± 0.22
13	3.19 ± 0.53	--	7.52 ± 1.50	2.51 ± 0.24
14	3.93 ± 0.39	--	8.80 ± 1.36	2.18 ± 0.39
15	4.94 ± 0.33	--	7.29 ± 1.35	2.61 ± 0.36
16	2.52 ± 0.20	4.83 ± 0.21	8.92 ± 1.06	5.50 ± 0.41
17	0.26 ± 0.06	1.30 ± 0.21	16.54 ± 1.11	2.56 ± 0.12
18	0.33 ± 0.08	2.22 ± 0.98	13.03 ± 1.17	6.75 ± 0.17
19	1.90 ± 0.03	4.11 ± 0.07	11.80 ± 2.41	4.56 ± 0.10
20	2.35 ± 0.08	4.56 ± 0.14	10.44 ± 0.73	4.25 ± 0.07

Número de muestra	Contenido de PHB (%) ± EE	Contenido de PHV (%) ± EE	Cont. de carbohid. (%) ± EE	Cont. de glicógeno (%) ± EE
21	2.83 ± 0.01	3.88 ± 0.22	10.54 ± 0.99	5.06 ± 0.08
22	2.82 ± 0.08	4.44 ± 0.32	8.16 ± 0.41	3.19 ± 0.10
23	7.87 ± 0.89	21.32 ± 0.94	9.68 ± 1.43	3.37 ± 0.11
24	2.38 ± 0.04	0.91 ± 0.09	14.73 ± 1.72	3.69 ± 0.08
25	2.12 ± 0.15	0.96 ± 0.08	12.23 ± 1.56	4.50 ± 0.09
26	2.40 ± 0.44	0	11.87 ± 0.58	5.19 ± 0.25
27	2.20 ± 0.41	0.82 ± 0.21	9.16 ± 0.17	5.25 ± 0.06
28	2.58 ± 0.84	0.82 ± 0.12	9.50 ± 1.19	1.42 ± 0.25
29	2.79 ± 0.92	0.73 ± 0.11	12.29 ± 1.25	1.91 ± 0.23
30	1.93 ± 0.75	0.52 ± 0.69	11.26 ± 1.32	2.07 ± 0.19
31	14.17 ± 1.02	0.88 ± 0.17	12.72 ± 0.34	1.86 ± 0.16
32	1.63 ± 0.34	0.73 ± 0.21	10.16 ± 0.24	1.92 ± 0.10
33	1.92 ± 0.42	0.96 ± 0.09	10.62 ± 0.32	2.30 ± 0.10
34	2.52 ± 0.10	0.47 ± 0.10	13.43 ± 0.55	2.06 ± 0.17

Tabla 4.36: Contenido de PHB, PHV, carbohidatos y glicógeno en las células para cada uno de los experimentos analizados, expresado en porcentaje másico. EE: error estándar.

Número de muestra	C ± EE	H ± EE	N ± EE	S ± EE	P ± EE
1	1.000 ± 0.0217	1.6011 ± 0.0333	0.1887 ± 0.0033	0.0445 ± 0.0237	--
2	1.000 ± 0.0100	1.3806 ± 0.0195	0.1896 ± 0.0044	0.0467 ± 0.0241	--
3	1.000 ± 0.0358	1.4716 ± 0.0078	0.2285 ± 0.0065	0.0450 ± 0.0029	--
4	1.000 ± 0.0281	1.5260 ± 0.0211	0.1852 ± 0.0050	0.0205 ± 0.0007	--
5	1.000 ± 0.0419	1.6845 ± 0.0249	0.1865 ± 0.0011	0.0275 ± 0.0007	--
6	1.000 ± 0.0031	1.4948 ± 0.0050	0.1996 ± 0.0003	0.0320 ± 0.0006	--
7	1.000 ± 0.0031	1.5044 ± 0.0096	0.1698 ± 0.0010	0.0324 ± 0.0008	--

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Número de muestra	C ± EE	H ± EE	N ± EE	S ± EE	P ± EE
8	1.000 ± 0.0134	1.4107 ± 0.0227	0.1894 ± 0.0010	0.0304 ± 0.0009	--
9	1.000 ± 0.0173	1.4946 ± 0.0101	0.1622 ± 0.0019	0.0332 ± 0.0010	--
10	1.000 ± 0.0095	1.5566 ± 0.0164	0.1605 ± 0.0012	0.0274 ± 0.0035	--
11	1.000 ± 0.0164	1.4553 ± 0.0227	0.1651 ± 0.0007	0.0324 ± 0.0006	--
12	1.000 ± 0.0196	1.5508 ± 0.0097	0.1734 ± 0.0004	0.0286 ± 0.0005	--
13	1.000 ± 0.0126	1.5640 ± 0.0082	0.1617 ± 0.0007	0.0295 ± 0.0005	--
14	1.000 ± 0.0169	1.6575 ± 0.0159	0.1645 ± 0.0005	0.0285 ± 0.0018	--
15	1.000 ± 0.0219	1.6304 ± 0.0130	0.1626 ± 0.0005	0.0237 ± 0.0007	--
16	1.000 ± 0.0087	1.4471 ± 0.0113	0.2048 ± 0.0010	0.0267 ± 0.0002	0.0115 ± 0.0001
17	1.000 ± 0.0293	1.1057 ± 0.0411	0.1702 ± 0.0007	0.0223 ± 0.0001	0.0133 ± 0.0001
18	1.000 ± 0.0368	1.4743 ± 0.0218	0.1893 ± 0.0006	0.0145 ± 0.0001	0.0105 ± 0.0001
19	1.000 ± 0.0363	1.5181 ± 0.0227	0.1979 ± 0.0006	0.0217 ± 0.0001	0.0147 ± 0.0002
20	1.000 ± 0.0373	1.5708 ± 0.0254	0.1904 ± 0.0018	0.0862 ± 0.0006	0.0087 ± 0.0001
21	1.000 ± 0.1403	1.5132 ± 0.0017	0.2001 ± 0.0004	0.0302 ± 0.0001	0.0109 ± 0.0001
22	1.000 ± 0.0447	1.5836 ± 0.0149	0.2077 ± 0.0010	0.0274 ± 0.0005	0.0102 ± 0.0003
23	1.000 ± 0.0373	1.5059 ± 0.0124	0.1956 ± 0.0027	0.0264 ± 0.0008	0.0102 ± 0.0002
24	1.000 ± 0.0414	1.4348 ± 0.0282	0.2115 ± 0.0010	0.0265 ± 0.0002	0.0108 ± 0.0001
25	1.000 ± 0.0408	1.4993 ± 0.0337	0.2117 ± 0.0005	0.0228 ± 0.0003	0.0189 ± 0.0005
26	1.000 ± 0.0090	1.3034 ± 0.0284	0.1980 ± 0.0033	0.0162 ± 0.0005	0.0095 ± 0.0002
27	1.000 ± 0.0329	1.5843 ± 0.0150	0.1978 ± 0.0024	0.0162 ± 0.0005	0.0112 ± 0.0002
28	1.000 ± 0.0285	1.5651 ± 0.0181	0.1818 ± 0.0050	0.0283 ± 0.0008	0.0110 ± 0.0003
29	1.000 ± 0.0224	1.4726 ± 0.0224	0.1811 ± 0.0014	0.0241 ± 0.0002	0.0135 ± 0.0001
30	1.000 ± 0.0470	1.4268 ± 0.0314	0.2057 ± 0.0017	0.0294 ± 0.0004	0.0116 ± 0.0002
31	1.000 ± 0.0325	1.4938 ± 0.0050	0.1922 ± 0.0009	0.0258 ± 0.0001	0.0150 ± 0.0002
32	1.000 ± 0.0956	1.5534 ± 0.0212	0.2109 ± 0.0013	0.0266 ± 0.0004	0.0144 ± 0.0004

Número de muestra	C ± EE	H ± EE	N ± EE	S ± EE	P ± EE
33	1.000 ± 0.0352	1.5019 ± 0.0126	0.1975 ± 0.0038	0.0290 ± 0.0006	0.0138 ± 0.0002
34	1.000 ± 0.0087	1.5403 ± 0.0174	0.1907 ± 0.0005	0.0267 ± 0.0002	0.0115 ± 0.0003

Tabla 4.37: Análisis elemental de las muestras de biomasa. Los resultados son en masa y están divididos por el contenido de carbono. EE: error estándar.

Una característica general de los resultados de los análisis de macromoléculas practicados es el elevado error experimental que se obtiene. Este error resultante es la suma de varios errores. Por un lado, durante el análisis se produce cierto error que es inherente a cualquier determinación experimental. En este caso, como los protocolos de análisis son largos e incluyen numerosas etapas, los diferentes rendimientos de las etapas hacen que vaya aumentando el error empírico etapa a etapa. Para minimizar este error, se realiza la determinación para varias alícuotas de una misma muestra de células. Así, el resultado promedio de todas ellas será más cercano a la realidad. Finalmente cabe también señalar que en la mayoría de los protocolos de análisis, después de un amplio tratamiento de la muestra, se acaba haciendo una determinación de la absorbancia comparándola con un blanco, metódica que no está exenta de posibles interferencias por otro componente.

4.5.3. Análisis de consistencia de los datos experimentales: reconciliación del análisis macromolecular con el análisis elemental.

Teniendo en cuenta que los datos experimentales tienen un importante error experimental asociado, se plantea confirmar la consistencia de los resultados, por ejemplo, comprobando el grado de cumplimiento del balance de carbono.

Para analizar la consistencia de los resultados experimentales se pueden utilizar varias técnicas, aunque la más sencilla es la denominada *modelo de caja negra*, donde todas las reacciones celulares son sumadas en una única reacción que representa el crecimiento global de las células. Este método básicamente consiste en una validación de los balances de materia.

Los balances de materia pueden ser convenientemente descritos por una matriz estequiométrica E , en la que la primera columna contiene la composición elemental de las proteínas, la segunda columna la de los lípidos, y así sucesivamente para todas las macromoléculas analizadas. Las filas de la matriz representarán los balances de materia de cada uno de los elementos que componen las células.

Esta matriz, multiplicada por un vector columna r , compuesto por el contenido macromolecular de la célula, da como resultado otro vector columna T , con la composición elemental de las células. El vector r es la incógnita del sistema y el vector T contiene los datos obtenidos experimentalmente.

No obstante, calculando así el contenido macromolecular de las células, no quedan grados de libertad y la solución del sistema es única, no habiendo redundancias que permitan comprobar la consistencia de los datos experimentales.

Los datos experimentales son redundantes cuando, por ejemplo, se dispone de más de un sensor para medir la misma variable o cuando se deben cumplir ciertas restricciones, como es el caso de los balances de materia. En el caso de poder disponer de más ecuaciones –linealmente independientes– que grados de libertad, el sistema se encuentra sobredeterminado. Es este caso, las medidas redundantes pueden ser utilizadas para (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

- a) calcular las concentraciones de metabolitos no medidos experimentalmente,
- b) aumentar la precisión de los resultados obtenidos mediante la aplicación de técnicas de minimización de errores,
- c) identificar errores sistemáticos o inconsistencias del modelo planteado.

Para disponer de más ecuaciones linealmente independientes que grados de libertad, y al haber determinado experimentalmente las concentraciones de macromoléculas, a la matriz E se le pueden añadir más filas, tantas como columnas existen, formando las filas nuevas una matriz identidad. Del mismo modo, en el vector columna T formado por la composición elemental de las células, se añaden más elementos con el contenido de macromoléculas medido experimentalmente.

Así, al llevar a cabo la multiplicación y encontrar más ecuaciones que incógnitas, se puede calcular qué vector solución es el que cumple con las ecuaciones minimizando el error. Además, como se conoce el error estándar de los datos experimentales, éste puede ser tenido en cuenta, a modo de pesos, para encontrar una mejor solución.

Para minimizar el error experimental se ha utilizado una aproximación similar a la de Lange y Heijnen (2001). Concretamente, para el cálculo se ha utilizado una rutina de MATLAB (lsqcov) la cual es la implementación del algoritmo de mínimos cuadrados con covarianza conocida. Proporcionando a la rutina la matriz estequiométrica E , el vector con los datos experimentales T y un vector con el error estándar de los datos, a partir del cual se puede calcular una matriz de covarianzas, la rutina calcula el vector r que minimiza el error, el error estándar estimado de r y el valor de la media del cuadrado del error. Con el vector de errores estimados y el valor de la media del cuadrado del error, si se asume que la matriz de covarianzas es conocida exactamente y no sólo de forma relativa, se puede calcular el error estándar de la solución, el cual es inferior al error estándar de los datos experimentales de partida. El hecho de utilizar la matriz de covarianzas permite conceder mayor peso a los datos experimentales que presentan mayor confianza.

Para la confección de la matriz E , compuesta por los datos estequiométricos, se ha calculado la composición elemental de las macromoléculas para el caso del *R. rubrum* o, en su defecto, para microorganismos lo más cercanos posible.

En el caso de la composición elemental de las proteínas, ésta se ha calculado utilizando el contenido medio de aminoácidos en las proteínas de *Rb. capsulatus* (tabla 1.8). En cuanto a los lípidos, la composición elemental se ha calculado teniendo en cuenta la composición elemental de los lípidos encontrados en los análisis de lípidos efectuados (ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido vaccénico) y su riqueza relativa. La composición elemental de los ácidos nucleicos ha sido calculada a partir del contenido medio de citosina y guanina (63.8-65.8%) y de adenina y tiamina (35.2%) en *R. rubrum*. En la tabla 4.38 se detallan las composiciones elementales de las macromoléculas utilizadas en los cálculos.

Proteínas	$\text{CH}_{1.592}\text{N}_{0.290}\text{O}_{0.351}\text{S}_{0.007}$
Lípidos	$\text{CH}_{1.906}\text{O}_{0.117}$
RNA	$\text{CH}_{1.350}\text{N}_{0.403}\text{O}_{0.632}\text{P}_{0.103}$
DNA	$\text{CH}_{1.362}\text{N}_{0.395}\text{O}_{0.620}\text{P}_{0.103}$
PHB	$\text{CH}_{1.505}\text{O}_{0.503}$
PHV	$\text{CH}_{1.560}\text{O}_{0.447}$
Carbohidratos	$\text{CH}_{1.667}\text{O}_{0.833}$
Glicógeno	CH_2O

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Tabla 4.38: Composición elemental de las macromoléculas utilizadas en los cálculos.

A continuación, se muestra el sistema de ecuaciones planteado utilizando, a nivel de ejemplo, los datos pertenecientes a una muestra de células. Primeramente, en la tabla 4.39 se resumen los resultados experimentales obtenidos para esta muestra en concreto. Con la composición elemental de la tabla 4.38 se elabora la matriz estequiométrica E , y con los resultados experimentales, tabla 4.39 en este caso, se crean el vector T y el vector con el error de T .

Proteínas	62.80 % ± 1.65 %
Lípidos	2.00 % ± 0.30 %
RNA	2.90 % ± 0.14 %
DNA	0.35 % ± 0.14 %
PHB	2.52 % ± 0.20 %
PHV	4.83 % ± 0.21 %
Carbohidratos	8.92 % ± 1.06 %
Glicógeno	5.50 % ± 0.41 %
C	1.0000 ± 0.0087
H	1.4471 ± 0.0113
N	0.2048 ± 0.0010
S	0.0267 ± 0.0002
P	0.0115 ± 0.0001

Tabla 4.39: Resultados experimentales obtenidos en los análisis de la muestra de células núm. 16. Las composiciones de macromoléculas están expresadas en porcentaje de la célula en peso. La composición elemental está referida al contenido de carbono, en peso. Estos datos han sido extraídos de la tabla 4.35, de la tabla 4.36 y de la tabla 4.37.

Utilizando notación matricial, el sistema se expresaría de la siguiente forma:

$$(E) \cdot r = T$$

Donde: E : matriz estequiométrica, de 13 x 8
 r : vector con las composiciones optimizadas, de 8 x 1
 T : vector de resultados experimentales, de 13 x 1

$$\begin{pmatrix}
 & \text{Prot} & \text{Líp} & \text{RNA} & \text{DNA} & \text{PHB} & \text{PHV} & \text{Carb} & \text{Glic} \\
 \text{C} & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\
 \text{H} & 1.5920 & 1.9064 & 1.3499 & 1.3617 & 1.5050 & 1.5600 & 1.6670 & 2.0000 \\
 \text{N} & 0.2902 & 0 & 0.4025 & 0.3952 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{S} & 0.0068 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{P} & 0 & 0 & 0.1030 & 0.1030 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{Prot} & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{Líp} & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{RNA} & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{DNA} & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{PHB} & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\
 \text{PHV} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\
 \text{Carb} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\
 \text{Glic} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1
 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \text{Prot} \\ \text{Líp} \\ \text{RNA} \\ \text{DNA} \\ \text{PHB} \\ \text{PHV} \\ \text{Carb} \\ \text{Glic} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \dots \\ \dots \\ \dots \\ \dots \\ 62.80 \\ 2.00 \\ 2.90 \\ 0.35 \\ 2.52 \\ 4.83 \\ 8.92 \\ 5.50 \end{pmatrix}$$

Figura 4.55: Esquema del sistema de ecuaciones sobredeterminado, en formato matricial, utilizado para minimizar el error experimental.

Resolviendo el sistema de ecuaciones, de acuerdo con la forma explicada, se obtiene el siguiente resultado para el ejemplo de la figura 4.55 (vector *r*):

Proteínas	63.74 % ± 0.34 %
Lípidos	1.80 % ± 0.29 %
RNA	5.58 % ± 0.11 %
DNA	3.18 % ± 0.11 %
PHB	2.51 % ± 0.20 %
PHV	4.81 % ± 0.21 %
Carbohidratos	7.78 % ± 0.68 %
Glicógeno	5.05 % ± 0.38 %

Tabla 4.40: Resultados obtenidos después del cálculo de minimización del error.

Comparando el error experimental del análisis (tabla 4.39) con el error después de este tratamiento (tabla 4.40), se observa que el error ha pasado de un 4.12% (suma de los errores del contenido de macromoléculas) a un 2.32%. Así pues, para esta muestra en concreto el error se ha reducido en un 44%. Cabe destacar que las composiciones de RNA y DNA son las que más variación han sufrido, hecho que se relaciona con el mayor error experimental de estas determinaciones.

Capítulo 4 – Resultados y discusión

En la tabla 4.41 y en la tabla 4.42 se resumen los resultados obtenidos en la reconciliación de los resultados de los análisis macromoleculares con los resultados de los análisis elementales para las 34 muestras analizadas.

Número de muestra	Cont. de proteínas (%) ± EE	Cont. de lípidos (%) ± EE	Cont. de RNA (%) ± EE	Cont. de DNA (%) ± EE
1	59.89 ± 1.30	6.58 ± 0.11	4.55 ± 0.66	1.87 ± 0.48
2	61.65 ± 1.20	6.29 ± 0.30	2.95 ± 0.32	4.59 ± 1.04
3	59.23 ± 0.82	7.45 ± 0.09	3.72 ± 0.88	3.18 ± 0.14
4	59.03 ± 1.01	6.83 ± 0.17	3.35 ± 0.74	2.10 ± 0.62
5	56.72 ± 1.17	8.81 ± 0.68	3.77 ± 0.69	2.59 ± 0.46
6	54.49 ± 0.82	7.47 ± 0.68	7.41 ± 0.59	3.06 ± 0.04
7	54.91 ± 1.85	10.00 ± 1.57	2.18 ± 1.22	1.08 ± 0.77
8	54.37 ± 0.98	7.49 ± 2.06	3.65 ± 0.60	4.70 ± 0.35
9	52.76 ± 1.14	10.21 ± 1.22	1.23 ± 0.46	2.49 ± 0.6
10	53.37 ± 0.53	9.01 ± 0.38	1.46 ± 0.25	1.63 ± 0.12
11	53.14 ± 0.47	13.12 ± 1.47	1.98 ± 0.08	1.21 ± 0.29
12	50.98 ± 0.32	12.95 ± 0.78	4.00 ± 0.08	2.63 ± 0.19
13	51.25 ± 0.79	11.57 ± 0.87	3.22 ± 0.42	0.61 ± 0.36
14	51.41 ± 0.30	9.93 ± 0.65	2.84 ± 0.17	1.16 ± 0.04
15	48.26 ± 0.75	11.53 ± 0.74	5.54 ± 0.29	0.31 ± 0.47
16	63.74 ± 0.34	1.80 ± 0.29	5.58 ± 0.11	3.18 ± 0.11
17	65.75 ± 0.26	3.93 ± 0.11	7.03 ± 0.14	1.74 ± 0.14
18	65.44 ± 0.22	2.11 ± 0.16	5.72 ± 0.37	1.75 ± 0.36
19	64.43 ± 0.08	1.14 ± 0.77	7.00 ± 0.18	0.50 ± 0.13
20	60.44 ± 0.56	4.06 ± 1.07	5.12 ± 0.12	3.18 ± 0.14
21	59.98 ± 0.18	1.88 ± 0.50	7.89 ± 0.05	0.38 ± 0.11
22	60.81 ± 0.48	5.04 ± 0.11	6.78 ± 0.06	1.93 ± 0.30
23	54.77 ± 0.83	0.98 ± 0.82	6.25 ± 0.29	3.40 ± 0.30
24	64.49 ± 0.27	1.87 ± 0.30	4.50 ± 0.22	5.56 ± 0.23
25	62.89 ± 0.41	1.98 ± 0.65	5.61 ± 0.11	2.05 ± 0.27
26	63.38 ± 0.77	2.10 ± 0.29	4.76 ± 0.15	4.13 ± 0.27

Número de muestra	Cont. de proteínas (%) ± EE	Cont. de lípidos (%) ± EE	Cont. de RNA (%) ± EE	Cont. de DNA (%) ± EE
27	60.86 ± 0.71	4.68 ± 0.64	6.20 ± 0.08	3.78 ± 0.17
28	61.56 ± 1.02	7.53 ± 0.41	6.70 ± 0.18	2.00 ± 0.04
29	59.28 ± 0.44	7.71 ± 0.43	5.29 ± 0.18	7.23 ± 0.20
30	60.50 ± 0.55	6.55 ± 0.26	5.63 ± 0.19	4.66 ± 0.25
31	61.64 ± 0.34	7.43 ± 0.29	4.47 ± 0.22	6.09 ± 0.26
32	60.07 ± 0.61	6.52 ± 0.18	7.27 ± 0.43	3.81 ± 0.36
33	59.07 ± 0.76	6.30 ± 0.20	7.87 ± 0.24	4.80 ± 0.23
34	61.44 ± 0.46	6.91 ± 0.60	3.20 ± 0.49	1.18 ± 0.39

Tabla 4.41: Contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en las células, expresado en porcentaje másico, después del proceso de minimización del error experimental. EE: error estándar.

Número de muestra	Contenido de PHB (%) ± EE	Contenido de PHV (%) ± EE	Cont. de carbohid. (%) ± EE	Cont. de glicógeno (%) ± EE
1	9.01 ± 0.40	--	10.37 ± 0.83	2.03 ± 0.02
2	2.43 ± 0.34	--	11.35 ± 0.82	2.86 ± 0.10
3	9.48 ± 0.33	--	7.10 ± 0.35	2.40 ± 0.17
4	18.35 ± 0.82	--	5.97 ± 1.42	2.24 ± 0.17
5	5.52 ± 0.11	--	13.46 ± 0.83	1.98 ± 0.14
6	6.95 ± 0.18	--	14.60 ± 0.72	2.26 ± 0.33
7	8.69 ± 0.66	--	18.60 ± 1.50	2.58 ± 0.15
8	6.68 ± 0.39	--	13.53 ± 2.17	2.89 ± 0.19
9	4.79 ± 0.63	--	17.01 ± 1.44	2.94 ± 0.48
10	10.07 ± 0.42	--	12.55 ± 0.46	3.27 ± 0.16
11	7.97 ± 0.55	--	11.97 ± 1.30	2.61 ± 0.11
12	3.92 ± 0.29	--	16.62 ± 0.87	2.00 ± 0.22
13	4.72 ± 0.51	--	20.30 ± 1.04	2.86 ± 0.24
14	4.93 ± 0.38	--	22.02 ± 0.94	3.44 ± 0.38
15	5.66 ± 0.33	--	20.44 ± 0.96	3.71 ± 0.35

Capítulo 4 – Resultados y discusión

Número de muestra	Contenido de PHB (%) ± EE	Contenido de PHV (%) ± EE	Cont. de carbohid. (%) ± EE	Cont. de glicógeno (%) ± EE
16	2.51 ± 0.20	4.81 ± 0.21	7.78 ± 0.68	5.05 ± 0.38
17	0.25 ± 0.06	1.16 ± 0.21	12.27 ± 0.96	2.50 ± 0.12
18	0.32 ± 0.08	1.03 ± 0.87	11.19 ± 0.94	6.70 ± 0.17
19	1.90 ± 0.03	4.11 ± 0.07	11.78 ± 1.32	4.56 ± 0.10
20	2.36 ± 0.08	4.59 ± 0.14	11.17 ± 0.69	4.26 ± 0.07
21	2.83 ± 0.01	3.96 ± 0.22	12.27 ± 0.59	5.07 ± 0.07
22	2.85 ± 0.08	4.94 ± 0.31	9.05 ± 0.38	3.25 ± 0.10
23	5.81 ± 0.84	18.95 ± 0.88	3.80 ± 1.15	3.33 ± 0.11
24	2.38 ± 0.04	0.90 ± 0.09	11.15 ± 1.18	3.68 ± 0.07
25	2.13 ± 0.15	0.97 ± 0.08	13.19 ± 1.22	4.5 ± 0.09
26	2.82 ± 0.42	0	12.46 ± 0.53	5.24 ± 0.24
27	3.06 ± 0.40	1.05 ± 0.20	9.33 ± 0.17	5.27 ± 0.06
28	3.72 ± 0.78	0.84 ± 0.12	11.97 ± 0.99	1.54 ± 0.25
29	2.23 ± 0.83	0.72 ± 0.11	10.99 ± 0.98	1.85 ± 0.23
30	1.72 ± 0.72	0.33 ± 0.67	10.49 ± 1.12	2.05 ± 0.19
31	1.66 ± 0.61	0.52 ± 0.17	11.17 ± 0.32	1.45 ± 0.16
32	1.91 ± 0.33	0.84 ± 0.21	10.31 ± 0.24	1.95 ± 0.10
33	2.01 ± 0.41	0.96 ± 0.09	10.67 ± 0.31	2.31 ± 0.10
34	2.60 ± 0.10	0.56 ± 0.10	15.98 ± 0.50	2.29 ± 0.16

Tabla 4.42: Contenido de PHB, PHV, carbohidratos y glicógeno en las células, expresado en porcentaje másico, después del proceso de minimización del error experimental. EE: error estándar.

Así pues, después del tratamiento de los resultados para minimizar el error, el promedio de reducción del error en las 34 muestras analizadas es del 43%.

4.5.4. Análisis de los resultados

Una de las primeras consecuencias de este tratamiento ha sido la minimización considerable del error experimental. Además, si se considera que el contenido en pigmentos de las células puede estar alrededor del 2% en peso, como en alguna

muestra puntual se ha observado, y que la fracción de cenizas (contenido inorgánico de las células) ronda el 5% en peso (Albiol, 1994), la suma de las macromoléculas analizadas alcanza el 100% del peso de la célula dentro del margen de error experimental.

En la figura 4.56 se ha representado el contenido celular en proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos en función de la velocidad de dilución a la que se obtuvieron las muestras estudiadas, es decir, en función de la velocidad específica de crecimiento. A pesar del error experimental, se puede observar como las diferentes fracciones de macromoléculas varían de forma significativa en función de las condiciones de cultivo. En concreto, el porcentaje de proteínas en la célula disminuye claramente a medida que aumenta la velocidad de dilución. Algún punto anormalmente bajo no debe ser tenido en cuenta, puesto que es fruto, como se verá más adelante, de una elevada acumulación de polímeros de reserva. Al estar expresados los contenidos como porcentajes máxicos, el aumento excepcional de una macromolécula produce valores anormalmente bajos en el resto.

Respecto a los porcentajes de carbohidratos y lípidos, la tendencia es opuesta al caso de las proteínas. A medida que la velocidad específica de crecimiento aumenta, la cantidad de carbohidratos y de lípidos aumenta notoriamente.

En el caso de los ácidos nucleicos, y en especial con el RNA, la tendencia no se observa de forma tan rotunda. Ciertamente, tomando valores medios para cada velocidad de dilución, la sensación es que el contenido disminuye a velocidades de crecimiento elevadas.

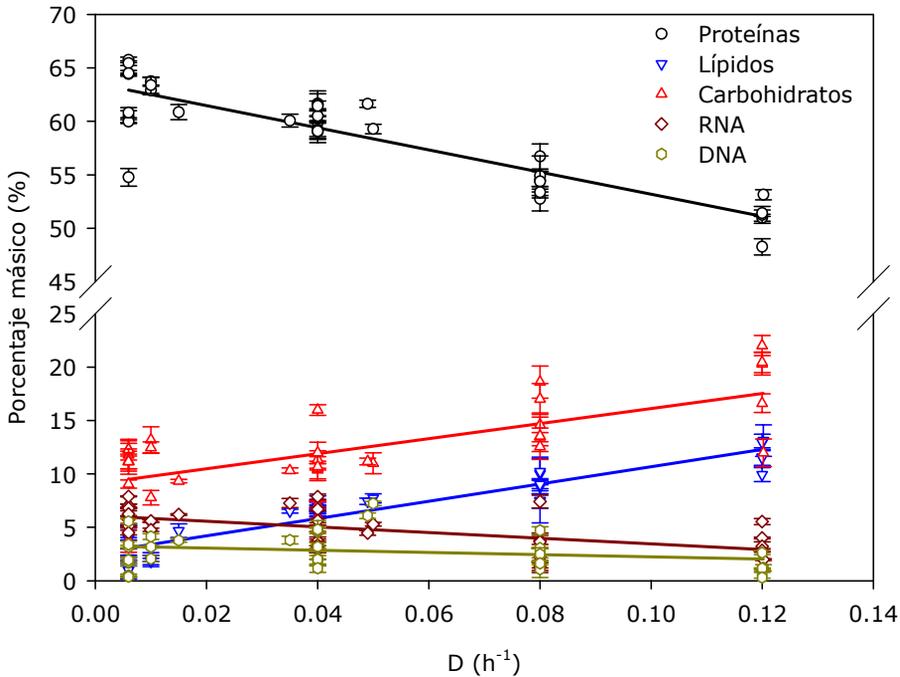


Figura 4.56: Contenido de las células de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos en función de la velocidad específica de crecimiento.

Los resultados obtenidos son coherentes con otros trabajos publicados para *E. coli* y *Paracoccus denitrificans* (Hanegraaf y Muller, 2001) en relación a las tendencias observadas respecto a la velocidad de dilución. La única variación se produce con el contenido de RNA, mientras que en la bibliografía aumenta respecto a la velocidad de crecimiento, en los resultados obtenidos en este trabajo disminuye ligeramente o se mantiene constante.

A diferencia de las proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, el porcentaje de polihidroxicanoatos (PHB y PHV) no tiene una relación directa con la velocidad de dilución. Por otro lado, analizando los resultados obtenidos se ha apreciado como las muestras que han resultado tener un elevado porcentaje de polihidroxicanoatos (PHA) han sido obtenidas en unas condiciones en las que la fuente de carbono estaba en exceso en el cultivo. Normalmente, este exceso de carbono era consecuencia de la limitación del crecimiento por el aporte de luz. Así pues, se ha analizado la variación del porcentaje de polihidroxicanoatos en función de un factor empírico calculado

como la concentración de carbono en el medio de entrada al reactor dividido por la irradiancia incidente, $[C]_0/\psi_0$. Consecuentemente, cuanto mayor sea esta relación, mayor acumulación de carbono habrá a priori en el cultivo, y mayor será el porcentaje de polihidroxicanoatos acumulados como polímeros de reserva.

En la figura 4.57 se ha representado el porcentaje de polihidroxicanoatos, como suma de los porcentajes de PHB y PHV obtenidos experimentalmente, en función de la relación $[C]_0/\psi_0$. Para concentraciones de carbono elevadas o valores de irradiancia incidente bajos, es decir para valores altos de la relación $[C]_0/\psi_0$ (correspondientes a estados estacionarios en que existe carbono residual sin consumir en el cultivo), se observa como el porcentaje de polihidroxicanoatos crece de forma exponencial respecto a la relación $[C]_0/\psi_0$. Cuanto mayor es el exceso de carbono en relación a la energía de la que se dispone, mayor es la acumulación de carbono intracelular en forma de polímero de reserva.

Contrariamente, para valores bajos de la relación $[C]_0/\psi_0$, el porcentaje de polihidroxicanoatos varía independientemente de este cociente. Este hecho puede ser debido a la existencia de otros factores, no tenidos en cuenta, que también intervienen en la acumulación de polímeros de reserva.

Durante el crecimiento de las células se puede producir un excedente o un déficit de equivalentes de reducción, en función del grado de reductancia de la fuente de carbono, de las células activas y de los polímeros de almacenamiento. Cuando existe un excedente de equivalentes de reducción, en vez de excretarlo al medio (como es el caso del etanol en la fermentación alcohólica), las células de *R. rubrum* tienden a acumularlo en su interior en forma de un compuesto de carbono, normalmente glicógeno o polihidroxicanoatos. De este modo, cuando se agota la fuente de carbono, y disponen de energía en exceso, pueden seguir la vía metabólica al revés y aprovechar el compuesto de reserva. Analizando los resultados mostrados en la tabla 4.42 se puede observar como el porcentaje de glicógeno en las células está entre el 2% y el 5% en peso. Por tanto, durante el crecimiento, es habitual que se produzca una cierta concentración de polímeros de reserva en el interior de la célula, en forma de PHA y/o de glicógeno, en función de los balances de grado de reductancia y de la energía disponible. Estas pequeñas acumulaciones de glicógeno y PHA, entorno al 5% en peso, no alteran el crecimiento de las células ni producen cambios en su morfología.

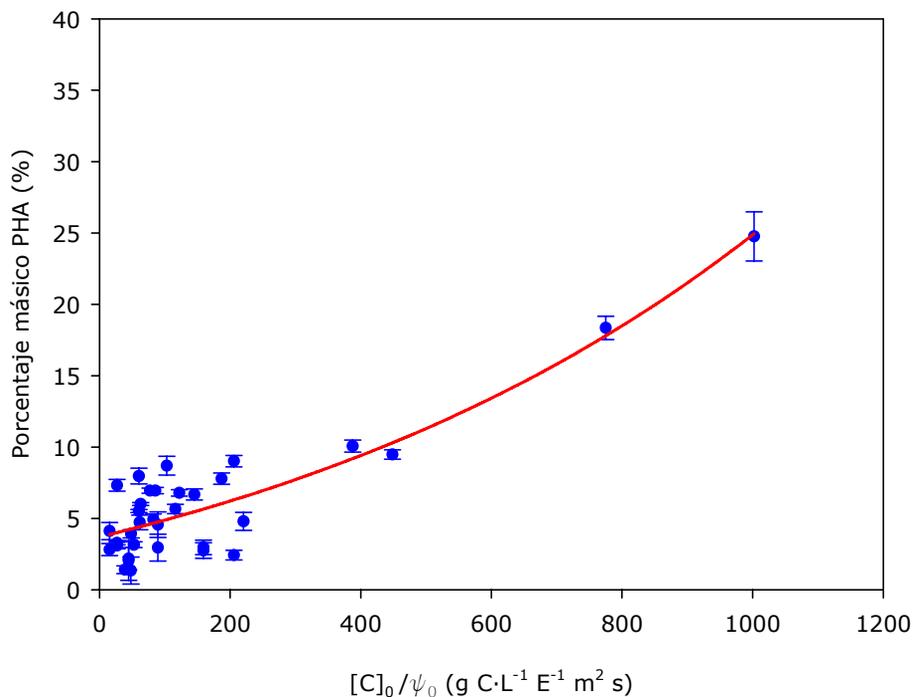


Figura 4.57: Porcentaje de polihidroxicanoatos (PHB y PHV) en función de un factor empírico calculado como la concentración de carbono del medio de entrada al reactor dividida por la irradiancia incidente.

Por otro lado, en todos los experimentos en que las células han sufrido un cambio de morfología y el crecimiento habitual se ha mostrado fuertemente alterado, se ha comprobado que la concentración de PHA es entorno al 10% en peso o un porcentaje superior.

Afortunadamente, en los casos en que es necesario predecir la acumulación de PHA para evitar consecuencias irreversibles para la buena marcha del cultivo, la correlación del porcentaje de PHA con la relación $[C]_0/\psi_0$ es satisfactoria.

Analizando el tipo de polihidroxicanoato acumulado en función de la fuente de carbono (resultados de la tabla 4.42 y figura 4.58) se puede observar cómo el PHB es el PHA acumulado de forma mayoritaria cuando la fuente de carbono contiene un número par de átomos de carbono (caso del ácido acético y del ácido butírico). Y también sucede al revés, cuando la cadena carbonatada del ácido graso contiene un

número impar de átomos de carbono (caso del ácido propiónico), el PHA acumulado de forma principal es PHV.

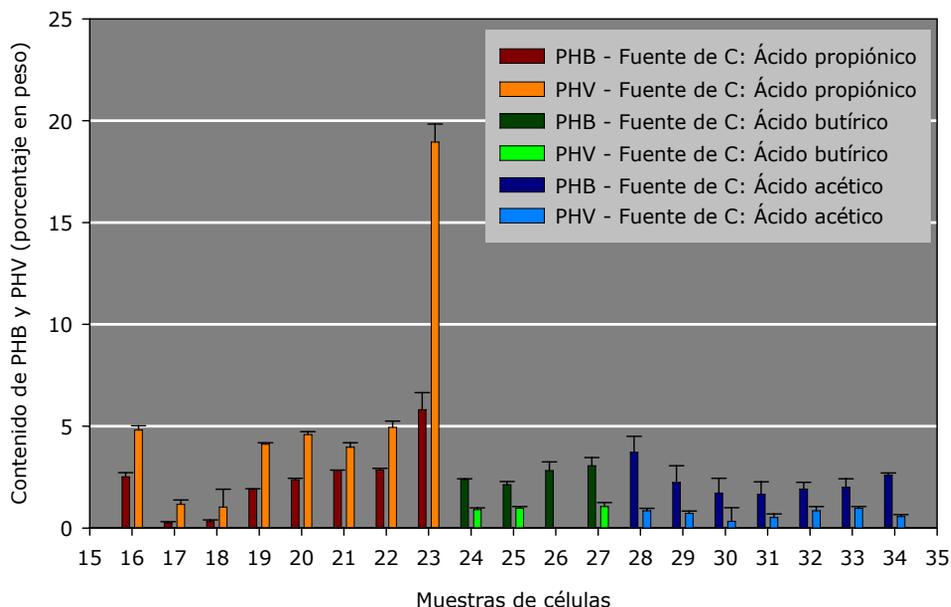


Figura 4.58: Porcentaje de PHB y PHV en función de la fuente de carbono.

De hecho, la predominancia de uno u otro PHA en función de si el número de átomos de carbono del ácido graso que constituye la fuente de carbono es par o impar es un hecho ampliamente documentado en la bibliografía (Sato *et al.*, 1992; Lemos *et al.* 1998 y Lemos *et al.* 2003).

Tal y como se aprecia en la figura 1.24, el monómero del PHB, 3-hidroxi butirato, se forma a partir del 3-hidroxi butiril-CoA, el cual proviene de la molécula de acetoacetyl-CoA, a su vez formada por la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA, que proceden del acetato. En cambio, cuando existe propionato en el medio, de acuerdo con la figura 1.25, se forma propionil-CoA, que condensa con acetyl-CoA para formar después de varias etapas el 3-hidroxi valeril-CoA, molécula que se acaba transformando en el monómero del PHV (3-hidroxi valerato). Esta es la explicación de porqué la fuente de carbono es tan determinante en la composición del PHA formado en el interior de la célula.

En realidad, mientras el PHB está formado exclusivamente por unidades de 3-hidroxi-bu-tirato, el PHV está formado por una mezcla de monómeros: 3-hidroxi-valerato (70%) y 3-hidroxi-bu-tirato (30%). Comúnmente el copolímero se denomina PHV, aunque en algunos textos se puede encontrar simbolizado como P(HB-HV).

4.5.5. Conclusiones

Los análisis de la composición de las células han verificado que los gránulos intracelulares observados en el microscopio están generalmente formados por polihidroxi-alcanoatos (PHA), concretamente β -polihidroxi-bu-tirato y β -polihidroxi-valerato, aunque en la mayoría de las muestras también han sido encontradas pequeñas cantidades de glicógeno.

Se ha observado que la acumulación de polímeros como reservas de carbono aumenta a medida que disminuye la disponibilidad de energía en relación a la cantidad de carbono disponible.

Además, también se ha constatado que la relación entre la cantidad de PHB y la de PHV formada depende directamente de la fuente de carbono. Concretamente, de si la fuente de carbono dispone de un número par o impar de átomos de carbono. Este efecto ha sido descrito para otros tipos de bacterias en la bibliografía.

Con los datos disponibles, se puede concluir que una disminución en la disponibilidad de energía limita la generación de células activas mientras la fuente de carbono se acumula en forma de polímeros de reserva intracelulares. Los polímeros de reserva acumulados son preferentemente PHA, los cuales también actúan como reserva de poder reductor.

Así pues, cuando la generación de células está limitada, ya sea por falta de energía, por falta de fuente de nitrógeno o por alguna otra razón, las células disminuyen la formación de células activas y ralentizan su división, y si les es posible, acumulan polímeros intracelulares como reserva de carbono. Cuando estos efectos se agudizan, las células cesan su proceso de división e incrementan su peso seco como consecuencia de la acumulación de polímeros de reserva, tal y como se ha observado en la figura 4.33.

Estos cambios metabólicos se presentan como reversibles. Sin embargo, ello requiere una modificación en las condiciones de cultivo. Por un lado, será necesario un

aumento de la disponibilidad de energía y, por otro lado, debido a la naturaleza reducida de la fuente de carbono acumulada, también se necesitará un aceptor de electrones. Bajo condiciones anaerobias, el dióxido de carbono o el bicarbonato pueden ser utilizados junto a la energía lumínica para revertir las condiciones. No obstante, bajo condiciones de microaerofilia, pequeñas cantidades de oxígeno pueden solucionar las dos necesidades.

4.6. Modelización del crecimiento de *R. rubrum* utilizando ácido acético como fuente de carbono

4.6.1. Objetivos del modelo

El desarrollo de un modelo matemático que describa de forma cuantitativa la relación entre el crecimiento celular de *R. rubrum*, la disponibilidad de energía radiante y fuente de carbono, se plantea con dos objetivos principales. En primer lugar, como herramienta que permita realizar una mejor interpretación conceptual de los resultados experimentales obtenidos. En segundo lugar, como un instrumento que ayude en el logro del objetivo final de este trabajo, que es el diseño del reactor piloto que deberá después construirse para formar parte de la Planta Piloto MELISSA.

Los modelos de transmisión de la radiación que se describen en la bibliografía, basados en el cálculo de la disponibilidad local de energía radiante son de naturaleza determinista, es decir, utilizando las leyes de la física deducen las ecuaciones que rigen la propagación de la luz. Por ello tienen una complejidad notable que requiere gran capacidad de cálculo para su utilización.

Como alternativa, se plantea desarrollar un modelo de naturaleza empírica, para ser utilizado en fotobiorreactores iluminados externamente, que evalúa la disponibilidad local de energía radiante y permite combinarla con las ecuaciones cinéticas de crecimiento de las bacterias para determinar la evolución de la concentración de células del cultivo respecto al tiempo.

Un modelo de estas características no podrá ser utilizado de forma amplia, pero por otra parte, tiene la ventaja de ser más sencillo y describir adecuadamente la familia de biorreactores con la que se ha trabajado, y en especial, también el tipo de reactor a diseñar dentro de este trabajo.

4.6.2. Ecuación de propagación de la radiación. Aproximaciones y parámetros utilizados.

El objetivo principal del modelo matemático que se desarrolla a continuación es determinar la distribución de la irradiancia local dentro del fotobiorreactor y relacionar este valor con la concentración de carbono para determinar la velocidad específica local de crecimiento. Además se intenta la consecución de este propósito con la mayor simplicidad matemática.

En este mismo sentido, para eliminar la complejidad que supone un análisis tridimensional de la propagación de la luz, se supone que la irradiancia en el interior del cultivo no varía en sentido vertical en el fotobiorreactor. Si las fuentes de luz están distribuidas de forma uniforme en sentido vertical y suficientemente alejadas de la superficie del fotobiorreactor, se pueden descartar los efectos de la parte superior y de la parte inferior del fotobiorreactor. Así, se puede considerar que la densidad del flujo de fotones en la dirección z es constante.

El modelo de distribución de la irradiancia también está basado en las siguientes suposiciones:

1. La fuente de luz tiene geometría esférica, es de radio r_0 , y emite radiación en sentido radial y de forma homogénea.
2. La atenuación de la radiación depende únicamente de la concentración de células y del camino óptico recorrido.
3. Las células se encuentran homogéneamente suspendidas en el cultivo y todos los factores que dependen de la concentración de células son constantes en todo el cultivo.

En la figura 4.59 se representa la sección horizontal de un fotobiorreactor cilíndrico con una lámpara situada en el centro. De acuerdo con las aproximaciones descritas anteriormente, el balance de energía radiante en la carcasa cilíndrica de grueso Δr se puede expresar como recoge la ecuación [4.25].

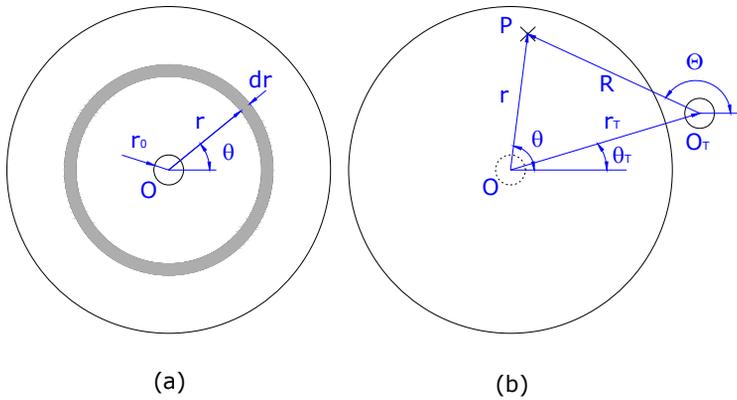


Figura 4.59: Representación esquemática de una sección horizontal de un fotobiorreactor con una única lámpara. (a) balance elemental de energía radiante suponiendo que la lámpara está situada en el centro del fotobiorreactor. (b) Traslación paralela para cualquier otra situación de la lámpara de $O(0,0)$ a $O_T(r_T, \theta_T)$

$$[4.25] \quad 2\pi r H \cdot \psi(X, r, \theta) \Big|_r - 2\pi (r + \Delta r) H \cdot \psi(X, r, \theta) \Big|_{r+\Delta r} = (2\pi r \cdot \Delta r \cdot H) (a \cdot \psi(X, r, \theta))$$

Donde:

- H: altura efectiva del fotobiorreactor
- a: coeficiente de atenuación de la luz dentro del cultivo
- r: distancia radial al centro del reactor
- θ : ángulo entre la dirección del rayo de luz y el eje de abscisas (OX)
- $\psi(X, r, \theta)$: irradiancia a una concentración celular X dentro de la sección horizontal del fotobiorreactor.

Dividiendo los dos lados de la igualdad [4.25] por el factor $(2\pi H \Delta r)$ y tomando el límite cuando $\Delta r \rightarrow 0$, se obtiene la ecuación [4.26]:

$$[4.26] \quad \frac{1}{r} \cdot \frac{d}{dr} [r \cdot \psi(X, r, \theta)] = -a \cdot \psi(X, r, \theta)$$

La irradiancia local se puede obtener integrando respecto al radio, desde el radio de la lámpara (r_0), donde la irradiancia es ψ_0 , hasta una posición arbitraria, r. Como a depende normalmente de la concentración de células y del camino óptico, la solución general es:

$$[4.27] \quad \psi(X, r, \theta) = \frac{r_0 \psi_0}{r} \exp \left[- \int_{r_0}^r a(X, r, \theta) dr \right]$$

En esta expresión, el coeficiente de atenuación $a(X, r, \theta)$ incluye todos los fenómenos que producen la atenuación de la luz, originada básicamente por los efectos de absorción y dispersión de la luz.

A bajas concentraciones de células y para caminos ópticos no demasiado largos, $a(X, r, \theta)$ es proporcional a la longitud del camino óptico y a la concentración de células:

$$[4.28] \quad a(X, r, \theta) = \varepsilon \cdot r \cdot X$$

Donde ε representa el coeficiente específico de absorción de luz de la *Ley de Lambert-Beer*. Así pues, la ecuación [4.27] puede ser simplificada de acuerdo con la expresión [4.29].

$$[4.29] \quad \psi(X, r, \theta) = \frac{r_0 \psi_0}{r} \exp[-\varepsilon \cdot X \cdot (r - r_0)]$$

Como la ecuación [4.29] proviene de la *Ley de Lambert-Beer*, sólo es válida cuando se cumplen las siguientes condiciones:

- Luz monocromática y colimada (luz cuyos rayos son paralelos entre sí, está enfocada en el infinito).
- No existe dispersión de la luz
- Las células absorben la luz de forma independiente.

Esta ecuación indica que el logaritmo de la irradiancia disminuye linealmente cuando aumenta la concentración de células (X). No obstante, la relación lineal entre la atenuación de la luz y la concentración de células tiene un límite, el cual depende de múltiples factores, como el tipo de microorganismos, el tipo de metabolismo que lleven a cabo, etc.

Para superar esta limitación, se han llevado a cabo dos opciones. Una consiste en incorporar los efectos de la dispersión de la luz (despreciados en la *Ley de Lambert-Beer*) en el modelo (Aiba, 1982; Cornet *et al.*, 1992, 1994, 1995). La otra posibilidad supone la utilización de un modelo empírico. La distribución de la irradiancia depende de múltiples y diversos factores, como la dispersión, la reflexión y la refracción de la luz causada por las células, el medio de cultivo, las burbujas, la superficie del reactor así como otros componentes del fotobiorreactor. Por tanto, es extremadamente complejo considerar todos estos efectos en el modelo.

No obstante, existen trabajos que relacionan satisfactoriamente y de forma empírica la atenuación de la irradiancia con la concentración de células (Ación Fernández *et al.*, 1997) o con la longitud del camino óptico (Katsuda *et al.*, 2000, Suh y Lee, 2003). En

el presente estudio, se adopta una aproximación empírica, utilizando ecuaciones que son una combinación de términos exponenciales, los cuales dependen de la concentración de células y del camino óptico recorrido. De esta forma, la ecuación [4.29] se transforma en la expresión [4.30]:

$$[4.30] \quad \psi(X, r, \theta) = \frac{r_0 \psi_0}{r} \exp[a \cdot \exp(-b \cdot r) + c \cdot \exp(-d \cdot r)]$$

Donde a , b , c y d son coeficientes empíricos que dependen de la concentración de células. Estos parámetros pueden variar en función de la longitud de onda de la luz, pero si se utilizan el mismo tipo de lámparas en toda la serie de experimentos, la influencia de la longitud de onda en los parámetros se puede considerar constante.

4.6.3. Cálculo de la irradiancia local

La ecuación [4.30] corresponde al caso especial de que sólo exista una única lámpara situada en el centro del fotobiorreactor. Para obtener la ecuación apropiada para el caso en que la lámpara se sitúe en un punto arbitrario del fotobiorreactor, diferente del centro, se utilizará el concepto de translación paralela (figura 4.59-b). Si la lámpara situada en el centro del fotobiorreactor, posición $O(0,0)$, se desplaza a una nueva posición, $O_T(r_T, \theta_T)$, la relación entre las primeras coordenadas y las segundas es la siguiente:

$$[4.31] \quad r \cos \theta = r_T \cos \theta_T + R \cos \Theta$$

$$[4.32] \quad r \sin \theta = r_T \sin \theta_T + R \sin \Theta$$

Donde r y θ son la distancia y el ángulo de la línea \overline{OP} , y R y Θ son la distancia y el ángulo de la línea $\overline{O_TP}$. Reordenando estas ecuaciones se obtienen las siguientes relaciones:

$$[4.33] \quad R = \sqrt{(r \cos \theta - r_T \cos \theta_T)^2 + (r \sin \theta - r_T \sin \theta_T)^2} = \sqrt{r^2 + r_T^2 - 2r r_T \cos(\theta - \theta_T)}$$

$$[4.34] \quad \Theta = \tan^{-1} \left[\frac{r \sin \theta - r_T \sin \theta_T}{r \cos \theta - r_T \cos \theta_T} \right]$$

Substituyendo r y θ en la ecuación [4.30] se obtiene la expresión que proporciona la irradiancia en un punto arbitrario P :

$$[4.35] \quad \psi(X, r, \theta) = \psi(X, R, \Theta) = \frac{r_0 \psi_0}{r} \exp[a \cdot \exp(-b \cdot r) + c \cdot \exp(-d \cdot r)]$$

Si $r_T=0$ y $\theta_T=0$, R y Θ son iguales a r y θ , respectivamente. En este caso la ecuación [4.35] se convierte en la expresión [4.30].

Así pues, cambiando la distancia respecto al centro y el ángulo donde está situada la lámpara, este modelo puede ser utilizado para calcular la irradiancia en el interior del fotobiorreactor en el que la lámpara está situada en una posición arbitraria. No obstante, sólo es válido para el caso en que exista una única fuente emisora de radiación.

Para ampliar el modelo a un sistema en que exista más de una lámpara, la irradiancia total se puede calcular como la suma de la irradiancia procedente de cada una de las lámparas. Por conveniencia, se expresará la distancia entre una lámpara y el centro del fotobiorreactor como $R_{k/n}$, donde n es el número total de lámparas y k es un número índice que va desde 1 hasta n . Así pues, como la irradiancia total en un punto arbitrario es la suma escalar de las irradiancias de cada una de las lámparas, la ecuación [4.35] se puede expresar como:

$$[4.36] \quad \psi_n(X, r, \theta) = \sum_{k=1}^n \frac{r_0 \psi_0}{R_{k/n}} \left[a \cdot \exp(-b \cdot R_{k/n}) + c \cdot \exp(-d \cdot R_{k/n}) \right]$$

Donde

$$[4.37] \quad R_{k/n} = \sqrt{r^2 + r_T^2 - 2r r_T \cos(\theta - \theta_{T, k/n})}$$

ψ_0 : irradiancia local disponible en un punto situado a r_0 del centro.

En el caso particular en el que todas las lámparas están situadas de forma simétrica y una de ellas está situada en la posición $\theta_T=0$, $R_{k/n}$ se puede generalizar de la siguiente forma:

$$[4.38] \quad R_{k/n} = \sqrt{r^2 + r_T^2 - 2r r_T \cos[\theta - (k-1)(2\pi/n)]}$$

Por tanto, con las expresiones [4.36]-[4.38] se puede calcular la irradiancia disponible en cualquier punto del cultivo. Este valor, juntamente con la concentración de carbono residual en el cultivo, nos permitirá calcular la velocidad específica local de crecimiento de las bacterias en ese punto.

4.6.4. Determinación y ajuste de los parámetros

Para determinar los parámetros a , b , c y d de la expresión [4.36], los cuales introducen en la ecuación la atenuación de la irradiancia debido a las células, se decide llevar cabo un experimento con iluminación monodimensional.

Se construye una cubeta transparente de metacrilato de 25 x 50 x 500 mm -ancho, alto y largo, respectivamente- (figura 4.60) la cual está expuesta a la irradiancia

procedente de un soporte con 8 lámparas halógenas, del mismo tipo con el que se han realizado todos los experimentos. El planteamiento consiste en llenar la cubeta con medio de cultivo de *R. rubrum* y medir la irradiancia incidente dentro del cultivo para diferentes condiciones. Como el objetivo es caracterizar la atenuación de la luz debido a la concentración de células y respecto a la longitud del camino óptico, se decide ir variando la distancia del sensor en relación a las lámparas, para varias concentraciones de células diferentes. No obstante, como en función del voltaje suministrado a las lámparas, el espectro de emisión varía ligeramente, para obtener un valor promedio también se optó por variar el voltaje suministrado a las lámparas para cada posición y concentración de células.

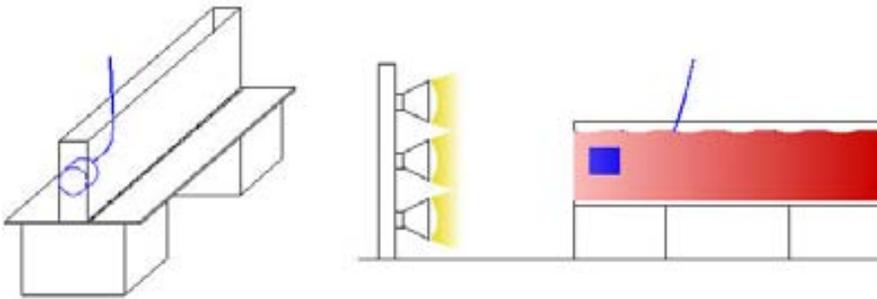


Figura 4.60: Esquema de la cubeta diseñada y construida para el experimento cuyo objetivo es la determinación de la atenuación de la luz en función de la concentración celular y del camino óptico.

Para medir la irradiancia incidente se utilizó un sensor de luz plano (Licor LI-190SA) conectado a un amplificador LI-250, el cual proporciona las lecturas en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en el rango 400-700 nm.

Las medidas experimentales de irradiancia incidente se empiezan a tomar en un cultivo concentrado de *R. rubrum* de 2.35 g/L de peso seco. Después, este cultivo se va diluyendo utilizando medio de cultivo fresco y se repiten las medidas de luz para las siguientes concentraciones de células (valores expresados en g/L de peso seco): 2.22, 1.97, 1.74, 1.54, 1.36, 1.20, 1.06, 0.94, 0.83, 0.73, 0.65, 0.50, 0.38, 0.27, 0.14 y 0.

Para cada una de estas concentraciones celulares, se mide la irradiancia incidente en diferentes posiciones o distancias respecto a las lámparas. Se define como posición 0, la posición del sensor en el que éste toca la pared frontal de la cubeta de metacrilato.

Teniendo en cuenta esto, se toman medidas a las siguientes distancias (distancias expresadas en cm respecto a la posición 0): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 14.0, 17.0, 22.0, 27.0, 32.0, 37.0 y 41.0.

Para minimizar las diferencias debido a la variación del espectro de emisión de las lámparas en función del voltaje suministrado, se mide la irradiancia incidente para las diferentes posiciones y concentraciones celulares antes expuestas para diferentes voltajes, concretamente, para los voltajes: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5 y 12 V. Posteriormente, para cada voltaje de una misma posición se calcula la relación ψ/ψ_0 y se calcula el promedio de todos los voltajes.

El modelo que mejor se adapta a los perfiles de la multitud de lecturas experimentales tomadas (2.557 en total) consiste en una suma de dos términos exponenciales negativos, los cuales dependen del camino óptico recorrido. Los coeficientes de los términos exponenciales son función de la concentración de células (ecuación [4.39]).

$$[4.39] \quad \frac{\psi}{\psi_0} = a \cdot \exp(-b \cdot L) + c \cdot \exp(-d \cdot L)$$

Donde:

$$a = a_1 X^2 + a_2 X + a_3$$
$$b = b_1 X^{b_2}$$
$$c = c_1 X^2 + c_2 X + c_3$$
$$d = d_1 X^2 + d_2 X + d_3$$

X es la concentración de células (en g/L) y L es la longitud del camino óptico (en cm). Mediante el método numérico de mínimos cuadrados se han encontrado los 11 coeficientes que mejor ajustan el modelo de la expresión [4.39] a los valores experimentales.

Los coeficientes que optimizan el ajuste son los siguientes:

$a_1 = -0.0977$	$b_1 = 29.126$	$c_2 = -0.4082$	$d_2 = 0.1736$
$a_2 = 0.4078$	$b_2 = 2.9265$	$c_3 = 0.9392$	$d_3 = 0.1450$
$a_3 = 0.0611$	$c_1 = 0.0978$	$d_1 = 0.0378$	

En la figura 4.61 se representan cuatro gráficas, a modo de ejemplo, donde se puede observar el ajuste del modelo a los valores experimentales para cuatro concentraciones celulares diferentes: 2.35, 1.36, 0.94 y 0.27 g/L de peso seco. En todos los casos el ajuste es satisfactorio y se puede afirmar que el modelo representa fielmente las irradiancias medidas dentro del cultivo. Cabe destacar que el parámetro

modelizado es la relación entre la irradiancia y la irradiancia incidente (irradiancia en la posición 0), así se cancela la constante correctora que debe aplicarse para tener en cuenta que la irradiancia se está midiendo en un medio diferente del aire.

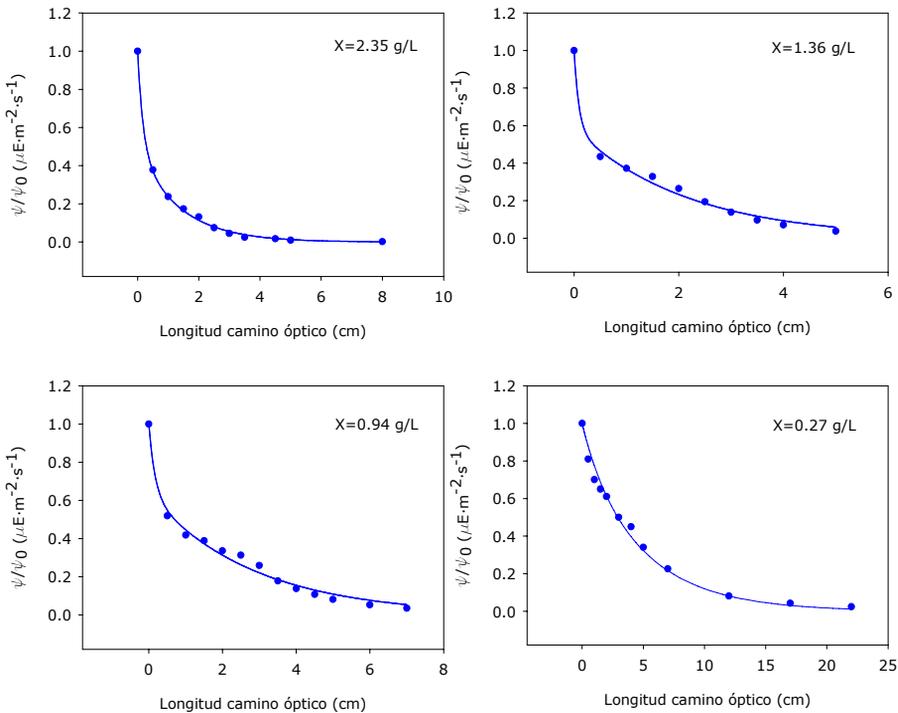


Figura 4.61: Ejemplos del ajuste del modelo teórico de la irradiancia incidente en función de la longitud del camino óptico y de la concentración de células (2.35, 1.36, 0.94 y 0.27 g/L). Los puntos representan los valores experimentales y la curva continua el modelo teórico.

En la figura 4.62 se representa el modelo de distribución de la irradiancia dentro del cultivo de *R. rubrum* en función de la distancia respecto a las lámparas (longitud del camino óptico recorrido) y de la concentración de células. Es notable la atenuación de la luz a concentraciones elevadas de células, puesto que a sólo unos 5 cm de profundidad, prácticamente la radiación está completamente atenuada.

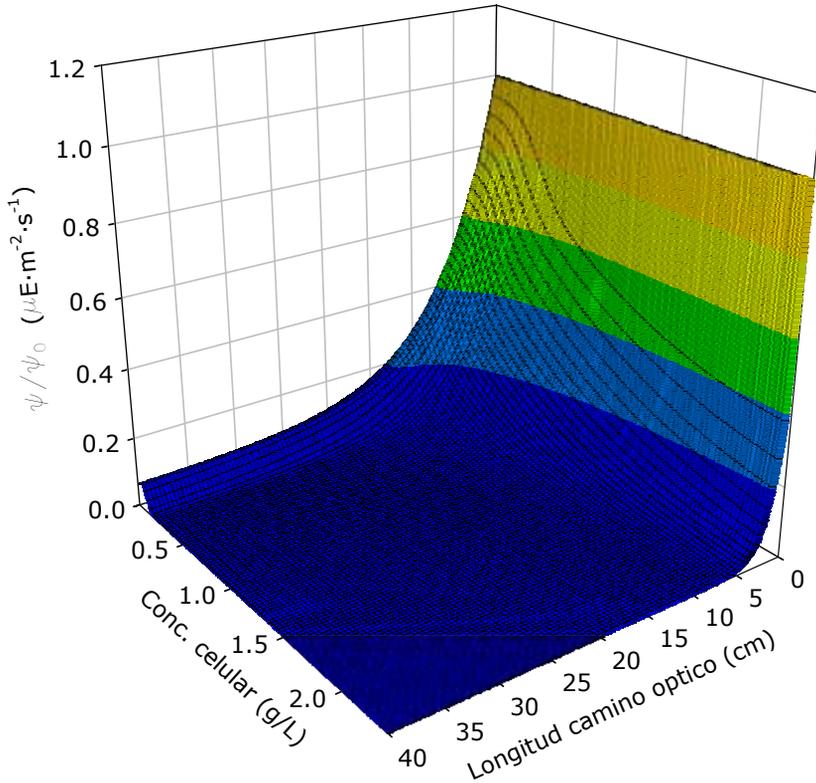


Figura 4.62: Representación del modelo de distribución de la irradiancia dentro del cultivo de *R. rubrum* en función de la longitud del camino óptico y de la concentración celular.

4.6.5. Calibración del modelo

Una vez que se dispone de un modelo que describe la irradiancia dentro del cultivo, se puede combinar con las ecuaciones cinéticas que describen el crecimiento de las células para obtener los perfiles cinéticos de células y de fuente de carbono. Estos perfiles teóricos se pueden comparar con los perfiles obtenidos en los diferentes experimentos llevados a cabo para determinar la bondad del modelo.

La ecuación de distribución de la irradiancia en el interior del cultivo se ha desarrollado teniendo en cuenta que la iluminación es monodimensional, es decir, sólo existe una dimensión (la profundidad). Como en los experimentos llevados a

cabo en las botellas *Roux* también son bajo este tipo de iluminación, la ecuación [4.39] se puede aplicar.

Cinética de crecimiento de R. rubrum

El crecimiento de las células de *R. rubrum* depende de la luz que reciben y de la concentración de carbono disponible. Es por esto que se ha optado por calcular la velocidad específica de crecimiento como el producto de dos factores, uno de los cuales depende de la luz que reciben y el otro de la concentración de carbono disponible. Así pues, la velocidad específica de crecimiento viene dada por la expresión [4.40].

$$[4.40] \quad \mu = \mu_m \left(\frac{\psi}{K_J + \psi} \right) \left(\frac{S}{K_S + S + S^2/K_I} \right)$$

- Donde:
- μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
 - μ_m : velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})
 - ψ : irradiancia local disponible ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
 - K_J : constante de afinidad por la radiación ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
 - S : concentración de carbono (g C/L)
 - K_S : constante de afinidad por el carbono (g C/L)
 - K_I : constante de inhibición por carbono (g C/L)

Se ha decidido utilizar un modelo como el de *Monod* para describir la regulación de la velocidad específica de crecimiento en función de la disponibilidad de luz por ser el más sencillo y proporcionar resultados aceptables. En el caso de la fuente de carbono, se ha utilizado el modelo de *Andrews* puesto que existen experimentos sobre ácido acético que sugieren que el crecimiento presenta inhibición a concentraciones moderadas de ácido acético. Además, Albiol (1994) ya utilizó el modelo de *Andrews* para describir el crecimiento de *R. rubrum* sobre ácido acético.

Las cuatro constantes cinéticas (μ_m , K_J , K_S y K_I) se determinan a continuación, utilizando los datos experimentales obtenidos en los experimentos en discontinuo en las botellas *Roux*.

Modelo de crecimiento con iluminación monodimensional

Mediante las ecuaciones [4.39] y [4.40] se puede determinar la velocidad específica de crecimiento en cada punto del cultivo. Como la distribución de la luz en el seno del cultivo establece un perfil de irradiancia, consecuentemente se producirá un perfil de velocidades específicas de crecimiento. Para obtener un valor medio de la velocidad específica de crecimiento será necesario integrar la ecuación [4.40] respecto a la profundidad del cultivo (en la práctica, la profundidad de la botella *Roux*):

$$[4.41] \quad \bar{\mu} = \frac{\mu_m}{L_T} \int_0^{L_T} \left(\frac{S}{S + K_S + S^2/K_I} \right) \left(\frac{\psi_0 (a \cdot \exp(-b \cdot L) + c \cdot \exp(-d \cdot L))}{K_j + \psi_0 (a \cdot \exp(-b \cdot L) + c \cdot \exp(-d \cdot L))} \right) dL$$

Finalmente, si se conoce cuanto vale la velocidad específica media (respecto a la profundidad) se puede resolver el sistema de ecuaciones diferenciales que relaciona la concentración de células y la concentración de carbono con el tiempo:

$$[4.42] \quad \begin{cases} \frac{dX}{dt} = \bar{\mu} X \\ \frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \end{cases}$$

- Donde:
- X: concentración de células (g/L)
 - $\bar{\mu}$: velocidad específica media de crecimiento (h^{-1})
 - S: concentración de sustrato (g C/L)
 - $Y_{X/S}$: rendimiento células-sustrato (g células/g C)
 - L_T : profundidad de la botella (m)

Integrando el sistema de ecuaciones [4.42] se obtiene el perfil de consumo de sustrato y producción de células respecto al tiempo.

En un análisis de los experimentos llevados a cabo en las botellas *Roux* en los que se utiliza el ácido acético como fuente de carbono se ha comprobado que el rendimiento células-sustrato medio durante el crecimiento se puede aproximar mediante la ecuación [4.43].

$$[4.43] \quad Y_{X/S} = -0.8831 \left(\frac{X_0}{S_0} \right)^2 + 2.3119 \left(\frac{X_0}{S_0} \right) + 1.1993$$

Donde X_0 es la concentración de células cuando empieza el crecimiento (en g/L) y S_0 la concentración de carbono cuando empieza el crecimiento (en g C/L).

Para determinar las constantes cinéticas (μ_m , K_j , K_s y K_i) se han utilizado todos los datos experimentales llevados a cabo en las botellas *Roux* en los que se utiliza el ácido acético como fuente de carbono (Capítulo 4.1, página 140). El método numérico utilizado ha sido el de mínimos cuadrados, consistente en encontrar qué valores de estas cuatro constantes minimizan la siguiente función objetivo:

$$[4.44] \quad \text{error} = \sum (Y_{\text{modelo}} - Y_{\text{experimental}})^2$$

Donde Y denota todos los valores experimentales obtenidos respecto al tiempo, tanto de concentración de células como de concentración de sustrato. Los cálculos se han realizado utilizando la función de minimización para ecuaciones multivariantes *fminsearch* (basada en el método *Simplex*) del lenguaje de programación MATLAB (versión 7.0.4.365 -R14- *Service Pack 2*, The MathWorks Inc. 2005).

Realizando este ajuste, los valores obtenidos que minimizan el error son los siguientes:

$$\begin{aligned} \mu_m: & 0.387 \pm 0.022 \text{ h}^{-1} \\ K_j: & 742.9 \pm 52.8 \text{ } \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \\ K_s: & 0.085 \pm 0.003 \text{ g C/L} \\ K_i: & 1.100 \pm 0.114 \text{ g C/L} \end{aligned}$$

La incertidumbre asociada a cada parámetro corresponde a un nivel de confianza del 95%. El intervalo de confianza se ha obtenido realizando un análisis de sensibilidad de los parámetros obtenidos en la optimización mediante el método de Draper *et al.* (1998) para estimar la precisión de los parámetros en un ajuste por mínimos cuadrados no lineal. El método de cálculo del intervalo de confianza se basa en la distribución F , que depende del número de parámetros ajustados (p), del número de puntos experimentales (m) y del nivel de confianza requerido (α):

$$[4.45] \quad f_{\text{objetivo}}(ff) = f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}}) \left\{ 1 + \frac{p}{m-p} F(p, m-p, 1-\alpha) \right\}$$

Donde: $f_{\text{objetivo}}(ff)$: función objetivo
 $f_{\text{objetivo}}(ff_{\text{opt}})$: valor de la función objetivo evaluada con los parámetros óptimos
 ff : vector de parámetros ajustables
 ff_{opt} : vector de parámetros que minimizan la función objetivo

De esta forma, para hallar el intervalo de confianza de uno de los parámetros es necesario fijar el resto, y así obtener una función objetivo con una única variable y

dos soluciones: los extremos del intervalo de confianza a un determinado nivel de confianza. De los dos extremos, se ha utilizado para expresar el intervalo de confianza el más desfavorable.

Este análisis de sensibilidad permite determinar la influencia del valor de cada uno de los parámetros en la respuesta del modelo a la vez que se estima la bondad de los parámetros hallados mediante la optimización.

En la tabla 4.43 se resume la variación máxima permitida para cada uno de los parámetros del modelo para un nivel de confianza del 95%:

Parámetro	Valor óptimo	Intervalo de confianza (95 %)	Variación máxima permitida
μ_m (h^{-1})	0.387	± 0.022	5.7 %
K_J ($\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)	742.9	± 52.8	7.1 %
K_S (g C/L)	0.085	± 0.003	3.5 %
K_I (g C/L)	1.100	± 0.114	10.4 %

Tabla 4.43: Intervalo de confianza y variación máxima permitida para cada parámetro para un nivel de confianza del 95%.

Así pues, de los resultados mostrados en la tabla 4.43 se desprende que la respuesta del modelo es más sensible respecto a cambios en el parámetro K_S que respecto a cambios en cualquier otro parámetro. De la misma forma, los cambios en el parámetro K_I son los que afectan en menor medida a la respuesta del modelo.

Representación de la calibración del modelo

Una vez se dispone de un conjunto de parámetros que optimizan el ajuste, se pueden representar sobre la misma gráfica los puntos experimentales y la curva teórica del modelo para observar visualmente el grado de ajuste. En principio, el ajuste ha de ser satisfactorio puesto que son los mismos experimentos que se han utilizado para la obtención de los parámetros óptimos.

En los experimentos en discontinuo, desde el momento en que se inocula el biorreactor lleno de medio de cultivo fresco con el inóculo hasta que las células empiezan a crecer, puede pasar un tiempo más o menos largo en función de varios

parámetros. Este periodo se llama tiempo de latencia y depende de factores como el cambio de condiciones que han sufrido las células del inóculo al cultivo (grado de dilución en el cultivo, diferencia de la fuente de carbono, diferencia de la disponibilidad de luz, etc.). Obviamente, el modelo desarrollado no contempla esta fase, puesto que es muy difícil de predecir, y en todos los experimentos ajustados se ha tomado como condiciones iniciales aquellas en las que las células empiezan el crecimiento.

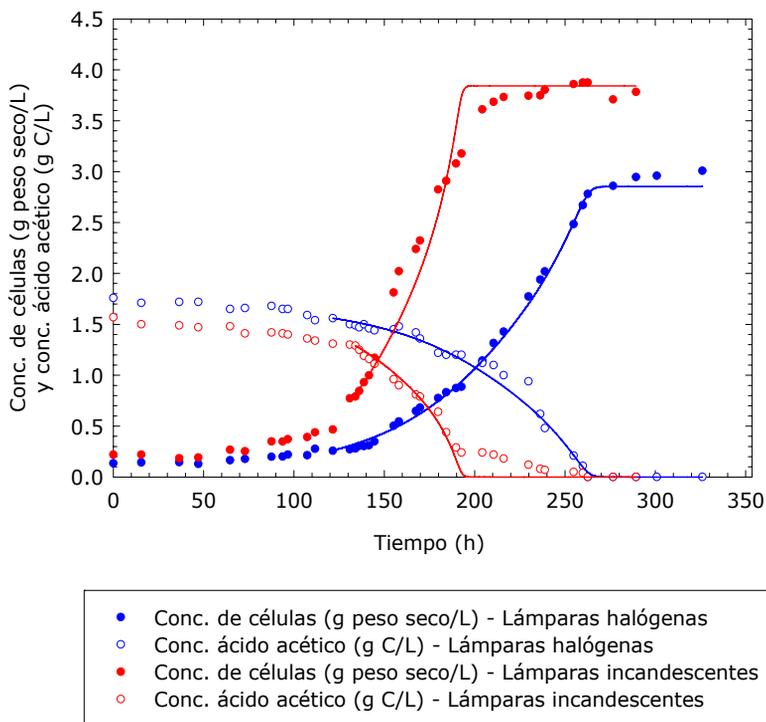


Figura 4.63: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales del ensayo número 1 (figura 4.4). Estos datos experimentales se han utilizado en la calibración del modelo.

En la figura 4.63 se representa el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el ensayo número 1 (anteriormente descrito en la figura 4.4), con iluminación halógena e incandescente. El ajuste del modelo a los datos obtenidos con iluminación halógena es muy satisfactorio, tanto en la curva de la concentración de

células como en la curva de la concentración de fuente de carbono (ácido acético) en el cultivo. En cuanto a la curva de la concentración de células, parece como si la curva teórica se detuviese antes que los puntos experimentales, pero no es del todo cierto. Cuando la curva que representa el modelo realiza el punto de inflexión, en ese punto se frena el crecimiento, posiblemente porque la gran limitación de luz. A partir de este punto, el leve aumento de peso seco experimental que se aprecia en la figura podría provenir de un cambio de metabolismo, por ejemplo, la acumulación de alguna reserva de carbono (PHB, glicógeno, etc.).

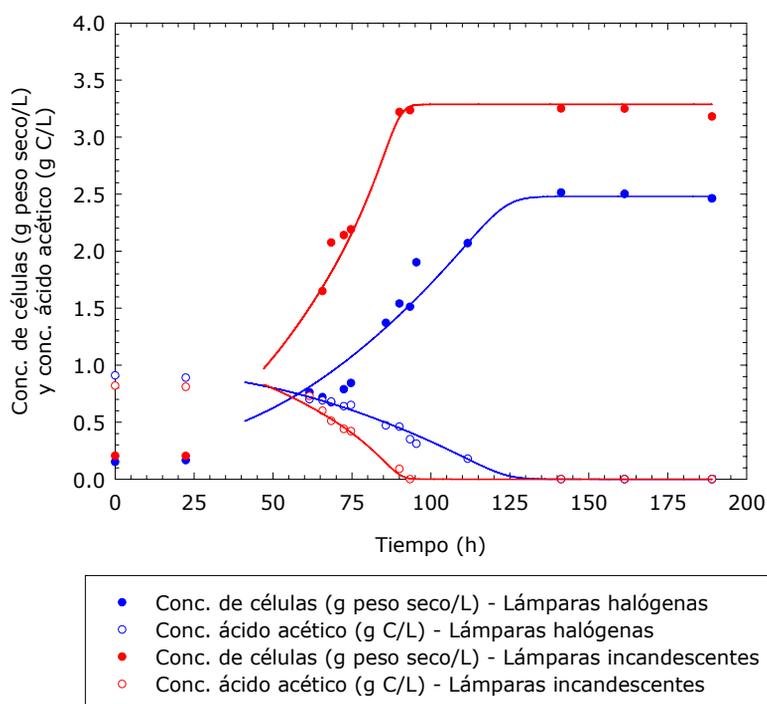


Figura 4.64: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales del ensayo número 2 (figura 4.5). Estos datos experimentales se han utilizado en la calibración del modelo.

En el caso de las curvas correspondientes a la iluminación incandescente, aunque el modelo y los datos experimentales están continuamente muy cerca, la forma de la curva teórica que representa la concentración de células es diferente de la forma trazada por los puntos experimentales. En este sentido, cabe precisar que la forma de esta curva experimental es diferente del resto de curvas obtenidas en estos

experimentos, independientemente del tipo de iluminación. En cuanto al perfil de consumo de sustrato, el ajuste es mejor que para la concentración celular, aunque los puntos experimentales exhiben un cambio de tendencia al que el modelo es incapaz de anticipar.

En la figura 4.64 se puede observar el grado de ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el ensayo número 2 (anteriormente descrito en la figura 4.5), en el que se utilizaba tanto iluminación halógena como incandescente. El ajuste es muy satisfactorio en los dos tipos de iluminación, tanto para describir el perfil de crecimiento de las células como para el perfil de consumo de carbono. Cabe reseñar que el punto de inicio de la curva teórica no coincide con ningún punto experimental puesto que en este ensayo, en una de las muestras tomadas aún no había empezado el crecimiento, y en la siguiente muestra, hacía ya un tiempo que las células estaban creciendo (la etapa de latencia fue inferior de lo que se esperaba). Así pues, el punto en que empieza la curva del modelo ha sido estimado.

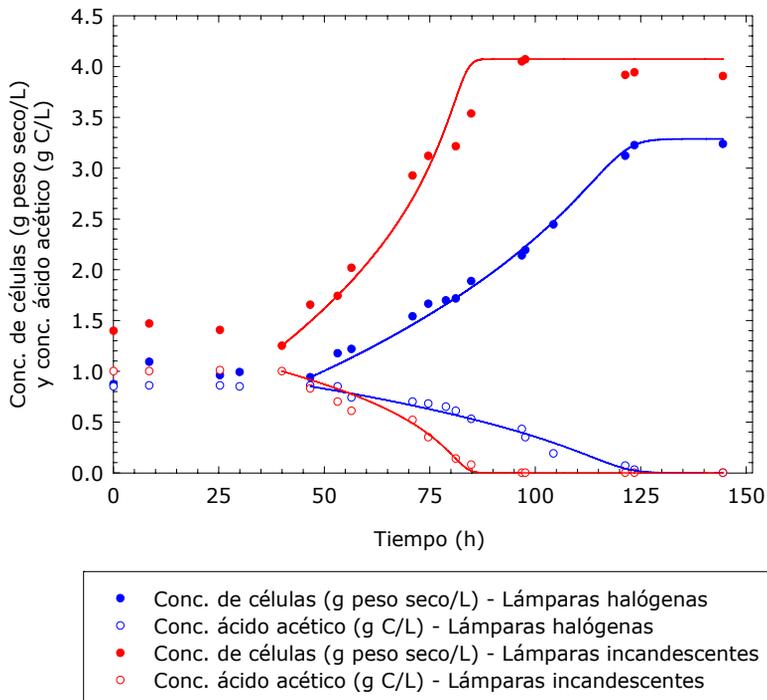


Figura 4.65: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales del ensayo número 3 (figura 4.6). Estos datos experimentales se han utilizado en la calibración del modelo.

En la figura 4.65 se puede observar el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el ensayo número 3 (anteriormente descrito en la figura 4.6), tanto con iluminación halógena como incandescente. El ajuste a los datos obtenidos bajo iluminación halógena es muy bueno en los dos casos, en el perfil de concentración de células y en el perfil de consumo de carbono.

Respecto a los datos obtenidos utilizando iluminación incandescente se observa que el modelo describe mejor el perfil de consumo de sustrato que la curva de concentración de células. El primer perfil se ajusta de forma muy satisfactoria y las pocas desviaciones que se aprecian son más atribuibles a error experimental que no a una tendencia errónea del modelo. En cuanto a la evolución de la concentración de células respecto al tiempo, el modelo sigue muy correctamente la tendencia de los puntos experimentales al inicio de la curva y se detiene también en el momento en que las células dejaron de crecer. En la zona en que se produce el punto de inflexión no se dispone de valores experimentales que puedan confirmar el acierto del modelo, aunque es probable que los puntos experimentales, con su error experimental asociado, estuviesen cerca del perfil predicho por el modelo. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que el modelo describe con precisión el momento en el que se agota el carbono residual en el medio.

En la figura 4.66 se representa el ajuste del modelo a los datos obtenidos en el ensayo número 6 (anteriormente descrito en la figura 4.13), en el que independientemente de la naturaleza de la luz, la irradiancia suministrada (expresada en moles de fotones en el rango 350-950 nm) es prácticamente la misma. En la gráfica se puede apreciar que el ajuste no es tan bueno como en alguno de los casos anteriores, pero en general, es aceptable. Los perfiles de consumo de sustrato son descritos por el modelo con mayor precisión que la evolución de la concentración de células. Las diferencias entre las predicciones del modelo para los dos tipos diferentes de iluminación vienen dadas básicamente por las condiciones iniciales, las cuales son diferentes en cada caso. No obstante, cabe señalar que al ser el nivel de iluminación semejante, la pendiente de las curvas de concentración de células en el tramo de crecimiento lineal es semejante.

El diferente grado de ajuste del modelo en los distintos experimentos no está relacionado con el nivel de iluminación, puesto que los datos experimentales bajo iluminación halógena han sido obtenidos en los cuatro ensayos descritos a un nivel de

irradiancia semejante. No obstante, el ajuste del modelo es mejor en los ensayos número 1 y 3 que en los números 2 y 6.

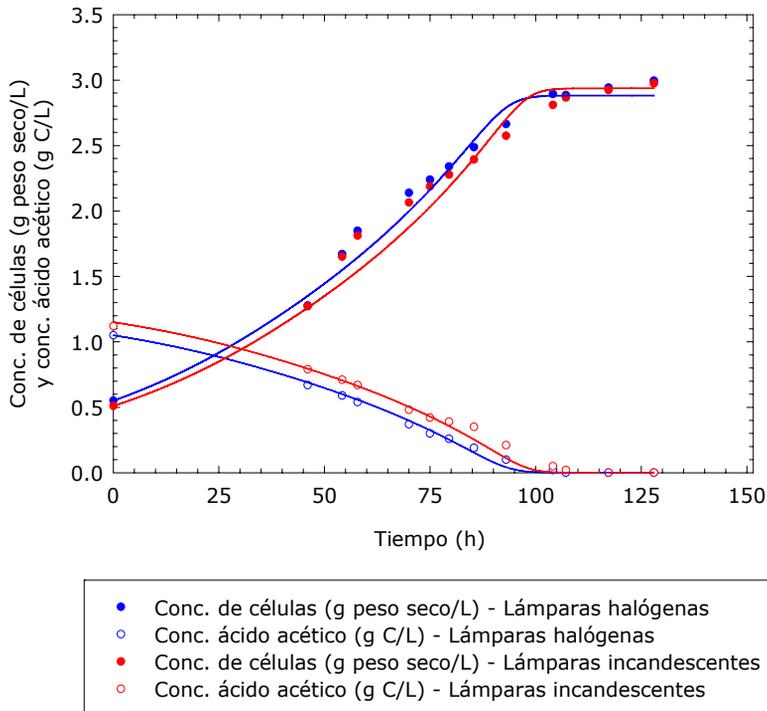


Figura 4.66: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales del ensayo número 6 (figura 4.13). Estos datos experimentales se han utilizado en la calibración del modelo.

A la vista del grado de ajuste del modelo a los datos experimentales que han servido para obtener el valor de los cuatro parámetros cinéticos utilizados, se desprende a priori que este conjunto de parámetros pautan un ajuste muy satisfactorio de la evolución del crecimiento de las células de *R. rubrum* y el consumo de carbono (en forma de ácido acético) cuando el cultivo se desarrolla bajo iluminación monodimensional.

No obstante, para la correcta evaluación de la bondad del modelo es indispensable comprobar cómo se ajusta a experimentos que no han sido utilizados en la determinación de ningún parámetro.

4.6.6. Aplicación del modelo a los experimentos en discontinuo en fotobiorreactores

Para comprobar el grado de ajuste del modelo a experimentos diferentes a los utilizados para su calibración, se han seleccionado cinco cultivos en discontinuo llevados a cabo con condiciones de iluminación variadas y en dos fotobiorreactores diferentes, ambos con iluminación exterior de geometría radial.

Una vez determinados los parámetros cinéticos del modelo, si las hipótesis en las que se basa el modelo son correctas, éste debería proporcionar un buen ajuste, con estos mismos parámetros cinéticos, sea cual sea el montaje experimental.

Para aplicar el modelo a un sistema con iluminación radial, como es el caso de los fotobiorreactores utilizados en este trabajo, es necesario calcular la velocidad específica media de forma diferente a la expresión [4.41]. Concretamente, se debe tener en consideración la irradiancia que procede de cada una de las direcciones en el momento de calcular la irradiancia local. Además, para calcular la velocidad específica media en el caso de un fotobiorreactor con iluminación exterior radial se debe integrar la irradiancia local respecto al radio y respecto al ángulo, de acuerdo con la expresión [4.46].

[4.46]

$$\bar{\mu} = \frac{\mu_m}{A} \int_0^{2\pi} \int_0^{R_0} r \left(\frac{\sum_{k=1}^n \left(\frac{r_0 \psi_0}{R_{k/n}} \right) [a \exp(-b \cdot R_{k/n}) + c \exp(-d \cdot R_{k/n})]}{K_J + \sum_{k=1}^n \left(\frac{r_0 \psi_0}{R_{k/n}} \right) [a \exp(-b \cdot R_{k/n}) + c \exp(-d \cdot R_{k/n})]} \right) \left(\frac{S}{S + K_S + S^2/K_I} \right) dr d\theta$$

Donde: A: sección del fotobiorreactor (m²)

R₀: radio del fotobiorreactor (m)

n: número de lámparas

k: índice del número de lámparas

r₀: radio en el que se conoce la irradiancia local disponible (ψ₀)

ψ₀: irradiancia local disponible en un punto situado a r₀ del centro.

R_{k/n}: distancia desde la lámpara k hasta el centro del fotobiorreactor.

Una vez que se conoce la velocidad específica media (respecto a la sección del fotobiorreactor) se puede resolver el sistema de ecuaciones diferenciales que relaciona la concentración de células y la concentración de carbono con el tiempo [4.47]:

$$[4.47] \quad \begin{cases} \frac{dX}{dt} = (\bar{\mu} \phi_{IL} - D) X \\ \frac{dS}{dt} = D (S_{ent} - S) - \frac{\bar{\mu} \phi_{IL} X}{Y_{X/S}} \end{cases}$$

Donde: X: concentración de células (g/L)

$\bar{\mu}$: velocidad específica de crecimiento media (h⁻¹)

ϕ_{IL} : fracción de volumen iluminado respecto al volumen total

D: velocidad de dilución (h⁻¹)

S: concentración de sustrato en el cultivo (g C/L)

S_{ent}: concentración de sustrato en el medio de entrada (g C/L)

Y_{X/S}: Rendimiento células-sustrato (g células/g C) (ecuación [4.43])

Integrando el sistema de ecuaciones [4.47] respecto al tiempo se pueden determinar la evolución de los perfiles de la concentración de células y de la concentración de sustrato en el interior del fotobiorreactor. Para ello, son necesarios los parámetros cinéticos obtenidos previamente en el ajuste del modelo y los parámetros físicos detallados en tabla 4.44, los cuales dependen del fotobiorreactor.

	Fotobiorreactor escala laboratorio	Fotobiorreactor escala piloto
Radio del sensor de luz, r ₀	0.0159 m	0.0159 m
Número de lámparas, n	5	6
Recorrido de la luz dentro del cultivo, r _T	0.064 m	0.048 m
Radio del fotobiorreactor, R ₀	0.064 m	0.048 m
Fracción de volumen iluminado, ϕ_{IL}	1	0.58

Tabla 4.44: Parámetros del modelo que dependen del fotobiorreactor utilizado.

Para comprobar la bondad del ajuste del modelo, se utilizan datos experimentales de cultivos en discontinuo, realizados de forma previa y conjunta a los experimentos en continuo cuyos resultados han sido presentados en los Capítulos 4.2 y 4.4. Concretamente, se han seleccionado cinco experimentos realizados en distintos fotobiorreactores, a diferentes niveles de iluminación, con distinta concentración

inicial de carbono (hecho que implica la obtención de diferentes concentraciones finales de células), tal y como se detalla en la tabla 4.45:

Cultivo en discontinuo	Biorreactor	ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Conc. inicial ácido acético (g C/L)	Conc. final de células (g PS/L)
# 1	Laboratorio	4858	1.2	2.1
# 2	Laboratorio	8279	1.9	2.9
# 3	Piloto	1256	1.1	2.5
# 4	Piloto	1256	1.4	3.2
# 5	Piloto	4474	1.0	2.4

Tabla 4.45: Características de los experimentos en discontinuo utilizados para estudiar la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales. PS: peso seco.

A continuación se representa el resultado proporcionado por el modelo conjuntamente con los datos experimentales para los cinco cultivos en discontinuo detallados en la tabla 4.45.

En la figura 4.67 se puede observar el ajuste del modelo a los puntos experimentales del cultivo en discontinuo # 1, realizado en el fotobiorreactor escala laboratorio y a una irradiancia incidente de $4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La evolución de la concentración de células y la de la fuente de carbono residual son descritas satisfactoriamente por el modelo, aunque el modelo predice el punto de agotamiento de la fuente de carbono ligeramente antes de lo que se comprobó experimentalmente. No obstante, también es cierto que en este punto la concentración de células no presenta ningún aumento claro, por lo que podría ser que la concentración de fuente de carbono fuese más baja de lo que las medidas experimentales dejan entrever.

En la figura 4.68 se comprueba la bondad del modelo para el cultivo en discontinuo # 2, llevado a cabo en el mismo fotobiorreactor que el cultivo # 1, pero a un nivel de iluminación mayor: $8279 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Observando la gráfica se aprecia que el ajuste es satisfactorio tanto en el caso de la evolución de la concentración de células como en el caso de la concentración de ácido acético libre en el medio. Cabe destacar que el

aumento en la pendiente de la curva que representa la concentración de células causada por una iluminación elevada es predicho por el modelo de forma correcta.

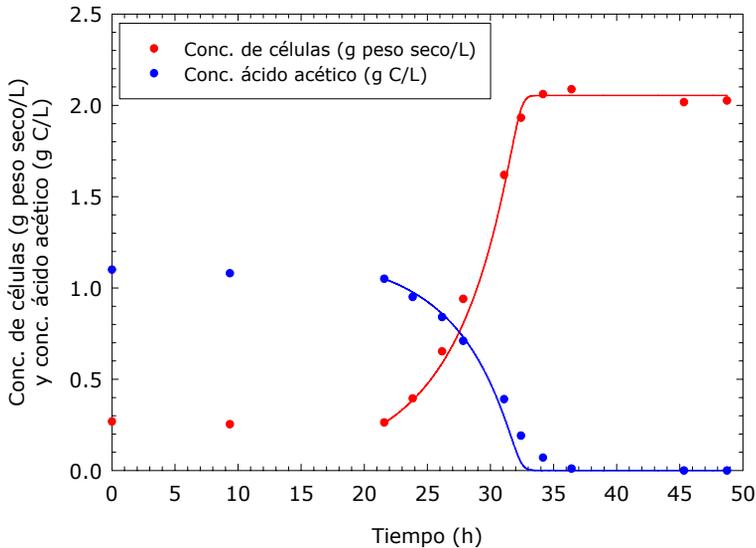


Figura 4.67: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el cultivo en discontinuo #1 (fotobiorreactor de escala laboratorio; ψ_0 : $4858 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En la figura 4.69 se comprueba la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales del cultivo en discontinuo #3, llevado a cabo en el fotobiorreactor piloto. La principal diferencia de este fotobiorreactor comparado con el de de escala laboratorio, dejando al margen la capacidad, reside en que el reactor piloto tiene una parte no iluminada (cabezal superior de acero inoxidable donde están situadas el mayor número de sondas) que supone el 42% del volumen total del reactor. Así pues, esta fracción de volumen se comporta como un volumen muerto en el que no existe aporte de energía y, por tanto, se asume que no contribuye al crecimiento celular.

En la figura 4.69 se aprecia como el ajuste del modelo a los puntos experimentales es correcto en términos generales, por lo que se puede confirmar que el modelo también se ajuste de forma correcta cuando la irradiancia incidente es baja, $1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

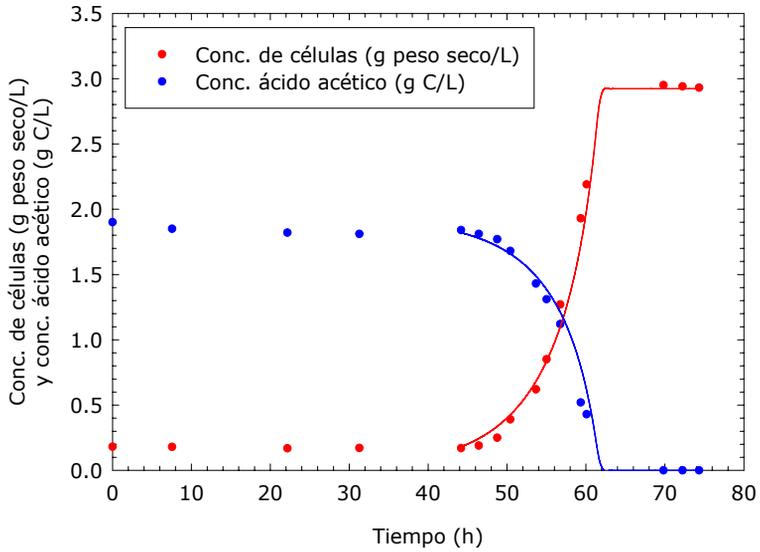


Figura 4.68: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el cultivo en discontinuo #2 (fotobiorreactor de escala laboratorio; ψ_0 : $8279 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

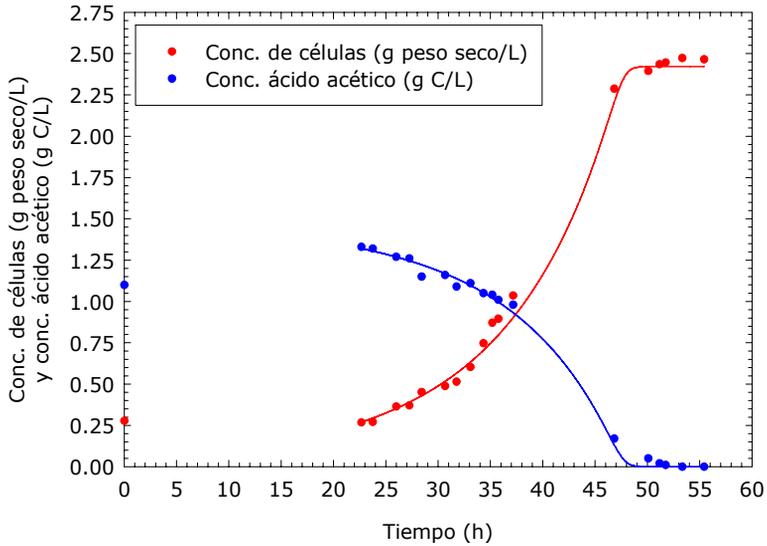


Figura 4.69: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el cultivo en discontinuo #3 (fotobiorreactor piloto. ψ_0 : $1256 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

En la figura 4.70 se comprueba la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales del cultivo en discontinuo #4, también en el fotobiorreactor piloto y con una irradiancia incidente de $1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, pero con diferentes concentraciones de células y de fuente de carbono en el inicio del cultivo. Observando la representación se puede apreciar que el ajuste es bueno y que el modelo predice con precisión el comportamiento del sistema observado experimentalmente.

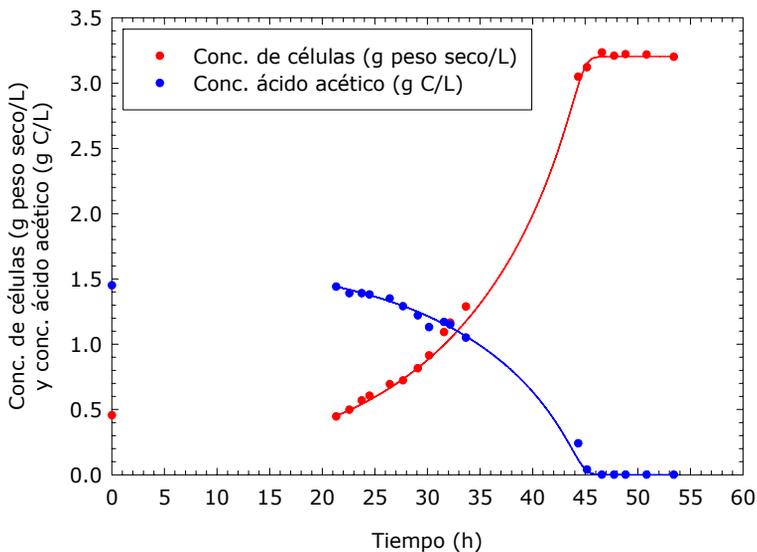


Figura 4.70: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el cultivo en discontinuo #4 (fotobiorreactor piloto. ψ_0 : $1256 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En la figura 4.71 se representa el ajuste del modelo a los datos experimentales de el cultivo en discontinuo #5, realizado en el fotobiorreactor piloto a una irradiancia incidente de $4474 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, nivel de iluminación cercano al máximo que se puede suministrar en este sistema. Observando la gráfica se aprecia que el ajuste es correcto y que el modelo predice con precisión la evolución de la concentración de células y la de ácido acético en las zonas de las curvas en las que se dispone de datos experimentales. En lo que respecta a la concentración de células, el modelo prevé correctamente el punto de inflexión de la curva, seguramente debido a la precisión con que calcula el momento en que se agota la fuente de carbono.

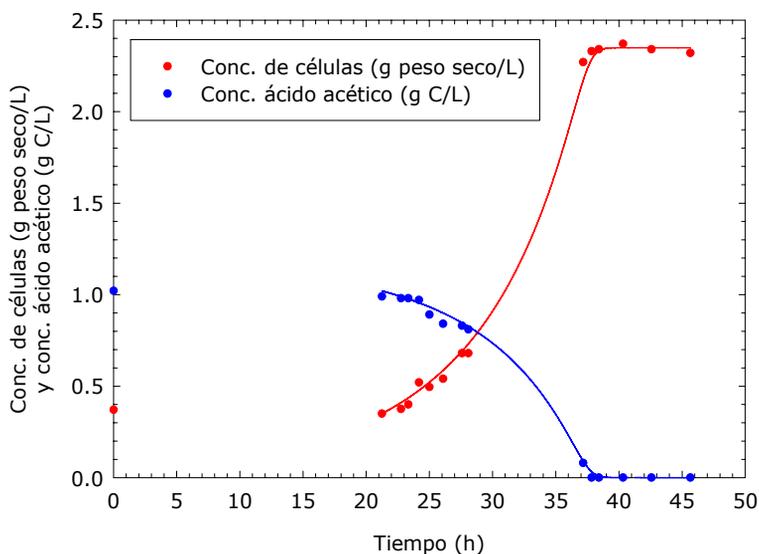


Figura 4.71: Comprobación del ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos en el cultivo en discontinuo #5 (fotobiorreactor piloto. ψ_0 : $4474 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

4.6.7. Aplicación del modelo a los experimentos en continuo en fotobiorreactores

Una vez aplicado el modelo con éxito a experimentos en discontinuo llevados a cabo en fotobiorreactores, para utilizar el modelo para predecir las condiciones de un cultivo en continuo no es necesario hacer ningún ajuste más en el modelo. Simplemente, a la hora de resolver el sistema de ecuaciones diferenciales [4.47], hay que tener en cuenta la velocidad de dilución y la concentración de ácido acético del medio de cultivo fresco que se alimenta al fotobiorreactor.

La única modificación introducida en el modelo para su aplicación a cultivos en continuo ha consistido en el cálculo del rendimiento células-substrato. Se han escogido los resultados experimentales de seis cultivos en continuo (cultivos 1, 4, 8, 10, 11 y 12, tabla 4.46), los cuales reúnen diferentes niveles de iluminación, velocidades de dilución, concentraciones de carbono, etc., para estudiar la relación entre el rendimiento células-substrato y el resto de factores externos, comprobando que utilizando sólo la concentración de carbono del medio fresco y la concentración de células en el cultivo se puede obtener una buena correlación. Concretamente, la

Capítulo 4 – Resultados y discusión

expresión obtenida (ecuación [4.48]) depende de cuatro parámetros, los cuales han sido obtenidos por el método de mínimos cuadrados.

$$[4.48] \quad Y_{X/S} = 0.6531 S_{\text{ent}}^{-1.0671} \cdot X - 0.1036 S_{\text{ent}} + 0.6545$$

Cultivo	Fotobio- rreactor	ψ_0 ($\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	D (h^{-1})	[C] _{ent} (g C/L)	Conc. cél. (g/L)	[C] _{cult} (g C/L)
1	Laboratorio	4858	0.04	1.0	1.6	≈0
2	Laboratorio	2229	0.04	1.0	1.454	≈0
3	Laboratorio	8279	0.08	0.5	0.827	≈0
4	Laboratorio	6486	0.08	0.5	0.834	≈0
5	Laboratorio	4858	0.08	0.5	0.788	≈0
6	Laboratorio	3441	0.08	0.5	0.795	≈0
7	Laboratorio	2266	0.08	0.5	0.757	≈0
8	Laboratorio	8279	0.12	0.5	0.754	≈0
9	Piloto	4474	0.04	0.4	0.689	≈0
10	Piloto	3044	0.04	0.4	0.679	≈0
11	Piloto	4474	0.04	0.2	0.314	≈0
12	Piloto	1256	0.035	0.2	0.327	≈0
13	Piloto	1256	0.04	0.2	0.321	≈0
14	Piloto	3788	0.04	0.2	0.325	≈0

Tabla 4.46: Resumen de los cultivos en continuo llevados a cabo en los fotobiorreactores utilizados en este trabajo en los que se ha utilizado ácido acético como fuente de carbono. Los cultivos 1, 4, 8, 10, 11 y 12 se han utilizado para establecer la ecuación que relaciona el rendimiento células-substrato con la concentración de carbono del medio de entrada y la concentración de células.

Utilizando la ecuación [4.48] en la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales [4.47], y para tiempos de integración elevados, se obtienen los resultados que se presentan en la tabla 4.47 correspondientes a la predicción del modelo de la concentración de células y de la de carbono libre en el cultivo en el estado estacionario. La desviación entre los resultados experimentales y los resultados del modelo se han calculado sólo para la concentración de células, puesto que las medidas de la concentración de carbono en el cultivo dieron en todos los casos por debajo del valor de detección.

Cultivo	Resultados experimentales			Resultados teóricos (modelo)		Desviación (conc. cél.)
	[C] _{ent} (g C/L)	Conc. cél. (g/L)	[C] _{cult} (g C/L)	Conc. cél. (g/L)	[C] _{cult} (g C/L)	Error relativo
1	1.0	1.600	≈0	1.533	0.012	4.18%
2	1.0	1.454	≈0	1.520	0.015	-4.55%
3	0.5	0.827	≈0	0.819	0.025	0.99%
4	0.5	0.834	≈0	0.815	0.026	2.23%
5	0.5	0.788	≈0	0.810	0.027	-2.79%
6	0.5	0.795	≈0	0.801	0.028	-0.79%
7	0.5	0.757	≈0	0.790	0.031	-4.40%
8	0.5	0.754	≈0	0.732	0.044	2.97%
9	0.4	0.689	≈0	0.683	0.020	0.91%
10	0.4	0.679	≈0	0.678	0.021	0.13%
11	0.2	0.314	≈0	0.329	0.020	-4.87%
12	0.2	0.327	≈0	0.326	0.021	0.31%
13	0.2	0.321	≈0	0.307	0.025	4.49%
14	0.2	0.325	≈0	0.328	0.021	-0.80%
Valor absoluto medio :						2.46%
Valor absoluto mínimo:						0.13%
Valor absoluto máximo:						4.87%

Tabla 4.47: Comparación de los resultados obtenidos con el modelo con los resultados experimentales (concentración de células en el estado estacionario). Los cultivos 1, 4, 8, 10, 11 y 12 se han utilizado para establecer la ecuación que relaciona el rendimiento células-substrato con la concentración de carbono del medio de entrada y la concentración de células.

Como se puede apreciar analizando los resultados expuestos en la tabla 4.47, el modelo calcula con notable precisión la concentración de células y la de carbono libre en el medio cuando el cultivo ha alcanzado el estado estacionario.

4.6.8. Explotación del modelo

Una vez desarrollado el modelo matemático que describe el crecimiento de *R. rubrum* y comprobado que los resultados que proporciona se ajustan a los resultados experimentales de diferentes cultivos, en distintos fotobiorreactores y en diferentes condiciones de cultivo, el modelo puede ser utilizado como una herramienta útil para profundizar en el análisis de los resultados experimentales obtenidos.

En esta línea, se ha utilizado el modelo para calcular la irradiancia media en el cultivo ($\bar{\psi}$) en casos experimentales en los que, después de una disminución de la irradiancia incidente (ψ_0), el cultivo ha llegado a la condición de lavado. Conocido el valor de la irradiancia media, es posible calcular la energía que las células están recibiendo y compararla con la cantidad de energía mínima que las células necesitan, calculada como la diferencia de entalpía entre las células y los substratos.

Para realizar esta comparación se ha partido de experimentos en continuo realizados a tres velocidades de dilución diferentes y en los que se ha ido reduciendo progresivamente la irradiancia incidente hasta llegar a la condición de lavado del cultivo. En la tabla 4.48 se detallan los experimentos utilizados, así como las condiciones de cultivo.

Experimento	Velocidad de dilución (h^{-1})	Concentración células (g/L)
1 - (Figura 4.16, pág. 160)	0.04	1.45 ± 0.01
2 - (Figura 4.22, pág. 168)	0.08	0.76 ± 0.01
3 - (Figura 4.23, pág. 169)	0.12	0.76 ± 0.01

Tabla 4.48: Experimentos en continuo en los que se ha ido reduciendo progresivamente la irradiancia incidente hasta llegar a la condición de lavado del cultivo.

En los tres experimentos, en los que el crecimiento está limitado por la cantidad de radiación, se produce una disminución de la irradiancia incidente en la que el cultivo, en las nuevas condiciones, no aguanta la velocidad de dilución. Probablemente, la causa sea que el nuevo aporte de luz es insuficiente para proporcionar a las células toda la energía que necesitan para consumir la fuente de carbono a la velocidad de dilución fijada. Así pues, en ese decremento de luz, se pasa de unas condiciones de

estado estacionario en las que la radiación que reciben las células es suficiente para mantener el crecimiento de forma estable, a un aporte de luz insuficiente para mantener el crecimiento. Así pues, la irradiancia incidente mínima para mantener a las células creciendo a la velocidad de dilución del experimento está comprendida entre los dos valores de irradiancia incidente probados.

En la tabla 4.49 se recogen los valores de irradiancia incidente y de irradiancia media antes y después del cambio de condiciones. La irradiancia media ha sido calculada mediante la ecuación [4.49] y equivale al promedio de irradiancia a la que una célula está expuesta de forma global, puesto que continuamente se está moviendo entre zonas con valores de irradiancia muy diferentes.

$$[4.49] \quad \bar{\psi} = \frac{1}{r} \int_0^r \psi(r) dr$$

Experimento	ψ_0 ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		$\bar{\psi}$ ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	
	EE	Lavado	EE	Lavado
1	2229	1290	432	252
2	2266	1290	587	327
3	4858	3441	765	488

Tabla 4.49: Valores de irradiancia incidente e irradiancia media antes y después de la variación de energía suministrada a las células. EE: estado estacionario (antes de variar la irradiancia); Lavado: lavado del cultivo (después de variar la irradiancia).

Los valores de irradiancia media ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pueden ser convertidos a flujo de energía (W) mediante la ecuación [4.50], suponiendo que todos los fotones captados son de una longitud de onda de 880 nm. Como ya se ha explicado anteriormente en este trabajo, la energía de los fotones de longitud de onda inferior a 880 nm (y, por tanto, más energéticos) es transferida hasta el centro de reacción, proceso en el que se pierde energía en forma de calor. A la práctica, la energía que llega al centro de reacción es la equivalente a la de radiación monocromática de 880 nm de longitud de onda.

$$[4.50] \quad E = \frac{hc}{\lambda}$$

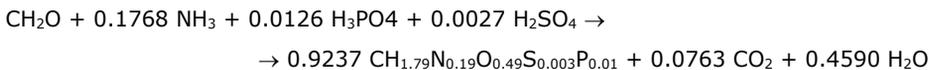
Como en los tres experimentos analizados la concentración de células es diferente (tabla 4.48), para poder comparar se calcula el flujo de energía que reciben las

células en relación a la concentración de células en el cultivo, es decir, vatios por gramo de peso seco. La tabla 4.50 muestra el flujo de energía (en vatios) por gramo de peso seco que las células reciben en cada uno de los experimentos estudiados.

Experimento	W/g peso seco	
	EE	Lavado
1	0.0080	0.0047
2	0.0209	0.0116
3	0.0272	0.0173

Tabla 4.50: Flujo de energía que reciben las células antes y después de la variación de la irradiancia incidente. EE: estado estacionario (antes de variar la irradiancia); Lavado: lavado del cultivo (después de variar la irradiancia).

Por otro lado, se puede calcular la energía mínima que las células necesitan para crecer como la diferencia entre el calor de combustión de las células y la suma de calores de combustión de los substratos consumidos, de acuerdo con la ecuación de crecimiento [4.2]:



Teniendo presentes los calores de combustión en condiciones estándar (298 K, 1 atm y pH 7) para el ácido acético (437 kJ/mol C), el amoníaco (383 kJ/mol C) y las células (560 kJ/mol C) (Stephanopoulos *et al.*, 1998), se obtiene que para formar un gramo de peso seco son necesarios 55 kJ. Si se considera la velocidad a la se debe formar esta cantidad de células (en función de la velocidad de dilución del cultivo), se obtiene el flujo de energía necesario para formar un gramo de peso seco. Los resultados de este cálculo se detallan en la tabla 4.51.

Los valores de la tabla 4.51 corresponden al flujo de energía mínimo necesario, puesto que no se ha tenido en cuenta la energía destinada al mantenimiento ni los diferentes rendimientos energéticos. Así pues, la energía mínima para el crecimiento será en todos los casos superior a los valores de la tabla 4.51.

Experimento	D (h ⁻¹)	W/g peso seco
1	0.04	0.0061
2	0.08	0.0121
3	0.12	0.0182

Tabla 4.51: Flujo de energía mínimo que las células necesitan para producir un gramo de peso seco en función de la velocidad de dilución del experimento. D: velocidad de dilución.

Si se compara el flujo de energía mínimo necesario con el flujo de energía que las células reciben, tanto en el estado estacionario como cuando el cultivo se está lavando (tabla 4.52), se observa que cuando se disminuye la irradiancia incidente y las células ya no pueden mantener la velocidad de crecimiento, en los tres casos el flujo de energía suministrado es inferior al que las células necesitan exclusivamente para transformar los sustratos en biomasa. Así pues, se confirma que la causa por la que disminuye la concentración de células al reducir la irradiancia incidente en los experimentos estudiados es por la insuficiencia de la energía recibida para mantener el crecimiento a la velocidad de dilución requerida.

En cambio, en los casos en que la concentración de células se encuentra en estado estacionario, se comprueba que en todos los casos la energía recibida es superior, como mínimo en un 30%, a la mínima necesaria para transformar los sustratos en células.

Experimento	Flujo energía real / Flujo energía mínimo (%)	
	EE	Lavado
1	131.1	77.0
2	172.7	95.9
3	149.5	95.1

Tabla 4.52: Relación (en porcentaje) entre el flujo de energía real y el flujo de energía mínimo necesario, antes y después de disminuir la irradiancia incidente. EE: estado estacionario (antes de variar la irradiancia); Lavado: lavado del cultivo (después de variar la irradiancia).

4.6.9. Conclusiones

En este subcapítulo se ha desarrollado un modelo de naturaleza empírica que está compuesto de dos partes. Por un lado, las ecuaciones que modelizan la distribución de la luz y permiten calcular el perfil de irradiancia dentro del cultivo en función de la radiación aportada, la concentración de células y la distancia hasta las lámparas. Por otro lado, se ha desarrollado un conjunto de ecuaciones cinéticas que, nutriéndose de la irradiancia disponible y de la concentración de carbono libre en el cultivo, calculan los perfiles de la concentración de células y de la de carbono residual respecto al tiempo.

Una vez confrontados los resultados del modelo con los datos obtenidos experimentalmente se pueden destacar las siguientes conclusiones. En primer lugar, se ha comprobado con éxito como el modelo es capaz de describir el crecimiento de *R. rubrum* cuando la iluminación es unidimensional e independientemente del tipo de iluminación utilizada. Asimismo, el modelo se ha generalizado y aplicado con éxito al caso de iluminación con geometría cilíndrica y se ha comprobado su eficacia en dos fotobiorreactores de características muy diferentes y a niveles de iluminación muy variados. Entre ellos varía, además de su capacidad y escala, la fracción de volumen que puede ser iluminado. Finalmente, se ha resuelto el modelo en las condiciones de un cultivo continuo, constatando que el modelo predice con precisión la concentración de células y la de carbono libre en el estado estacionario.

Por tanto, el modelo desarrollado, al predecir con relativa precisión los estados transitorios del cultivo de *R. rubrum* se presenta como una herramienta útil para predecir los cambios que puede sufrir el cultivo ante un cambio en las condiciones de cultivo. Así, se ha aplicado de forma satisfactoria para confirmar y ayudar a comprender mejor resultados experimentales obtenidos.

Además, considerando la facilidad y precisión con la que se puede aplicar a más de un fotobiorreactor, se puede utilizar como una herramienta más que ayude en el diseño y cambio de escala de fotobiorreactores. Especialmente, si se tiene en cuenta que uno de los aspectos más delicados en el escalado de un fotobiorreactor atañe a la transferencia de la luz y a la eficacia de iluminación.

En esta línea se ha utilizado en el capítulo siguiente, que tiene por objetivo el diseño de un fotobiorreactor para el cultivo de *R. rubrum* a nivel de la Planta Piloto MELISSA, como se describe en el siguiente capítulo.

4.7. Diseño de un fotobiorreactor piloto

4.7.1. Introducción

En el marco de la operación de la planta piloto, uno de los objetivos a corto plazo es la implementación de todos los compartimentos que componen el bucle MELiSSA conectados entre sí y a una escala que sea suficientemente representativa para demostrar la validez del concepto y de la aproximación seguida. En esta etapa de integración del bucle MELiSSA es también esencial demostrar la operación de todo el sistema, de forma controlada y estable, durante un periodo de operación significativo. Para ello, los distintos compartimentos deben ser llevados a un volumen acorde con sus características y un determinado escenario para esta etapa de integración y demostración. El escenario marcado es el de producir el O₂ equivalente a una persona y la alimentación correspondiente a un 20%, utilizando además como modelo del compartimento de la tripulación un conjunto de animales de laboratorio aún no definido (en estudio).

Los biorreactores que componen actualmente los compartimentos III y IVa ya poseen la capacidad suficiente para cumplir el objetivo marcado. En lo que respecta a los compartimentos I y IVb (cámara de plantas superiores), éstos han sido diseñados y construidos para satisfacer las necesidades requeridas. Así pues, el único compartimento que actualmente necesita un fotobiorreactor de capacidad superior al actual es el compartimento II.

A continuación, se determina cuál es la capacidad necesaria que debe tener el fotobiorreactor del compartimento II para que el bucle MELiSSA esté en su conjunto dimensionado para el escenario descrito.

4.7.2. Dimensionado del Compartimento II dentro del bucle MELiSSA

El objetivo principal del compartimento II dentro del bucle MELiSSA consiste en consumir los ácidos grasos volátiles que proceden del primer compartimento, transformándolos en biomasa. Así pues, la optimización de este compartimento

implica la utilización del menor volumen posible asegurando que en todo momento los ácidos grasos volátiles sean consumidos completamente.

Por tanto, el primer paso será determinar qué cantidad de ácidos grasos volátiles deberá consumir este compartimento en condiciones normales de operación. El volumen total de este fotobiorreactor dependerá fundamentalmente de la cantidad de ácidos grasos volátiles que deberá ser consumida y de la velocidad a la que se produzca este proceso.

Determinación de la productividad necesaria

La cantidad de ácidos grasos volátiles que se obtendrá del compartimento I se alimentará en el compartimento II y dependerá de la alimentación al Compartimento I, y en definitiva, del bucle MELiSSA y de sus condiciones de operación. Suponiendo que las condiciones de operación se mantengan constantes, la producción de ácidos grasos volátiles dependerá de la cantidad de materia fecal humana, la cantidad de plantas (fracciones comestible y no comestible) y la cantidad de *R. rubrum* y *Arthrospira* que se introduzcan en el primer compartimento. Este hecho obliga a considerar posibles escenarios diferentes y, en función de las suposiciones que se hagan, la cantidad de ácidos grasos volátiles que se generarán en el primer compartimento variará significativamente.

El compartimento de plantas superiores que se instalará a corto plazo en la Planta Piloto estará compuesto por 3 cámaras de plantas con 5 m² de superficie de cultivo cada una, acorde con el objetivo de producir el oxígeno necesario para mantener a una persona. En estas cámaras, se empezará trabajando con un cultivo de lechugas, remolachas y trigo, a partes iguales.

En cuanto al resto de parámetros, como por ejemplo la fracción de *Arthrospira* que se extraerá del bucle, la fracción comestible de las plantas que se extraerá del bucle, etc., son variables y se irán modificando para estudiar el comportamiento del bucle. Se analizarán tres escenarios posibles para determinar qué cantidad de ácidos grasos volátiles pueden entrar en el compartimento II.

Los escenarios a analizar son tres: I: el escenario más probable, II: un escenario intermedio y III: el escenario más desfavorable desde el punto de vista del aporte de materia al Compartimento I (aporte máximo). En el cálculo de los tres escenarios se han supuesto los siguientes parámetros como constantes:

Parámetros constantes en los escenarios I, II y III	
Productividad del cultivo de plantas:	6 g/(m ² · día)
Superficie de cultivo:	15 m ²
Fracción aprovechamiento de las plantas:	0.855
Eficiencia degradación en el C-I:	60%
Producción <i>Arthrospira</i> C-IVa:	36 g/día

En la tabla 4.53 se definen las características de los tres escenarios de estudio.

Escenario	I	II	III
Fracción de la materia fecal producida que se introduce en el compartimento I	1	1	0
Fracción de la <i>Arthrospira</i> producida que se introduce en el compartimento I	0.6	1	1
Fracción de <i>R. rubrum</i> producido que se introduce en el compartimento I	1	1	1
Fracción de comida comestible que se introduce en el compartimento I	0	0	1

Tabla 4.53: Suposiciones que definen los tres escenarios planteados. I: escenario más posible; II: escenario intermedio; III: escenario más desfavorable.

En el escenario I se contempla que el alimento del compartimento I sea la materia fecal y la orina producidas por una persona, el 60% de la *Arthrospira* producida en el compartimento IVa, el 100% del *R. rubrum* producido en el compartimento II y la fracción no comestible de las plantas cultivadas. Así pues, el 40% de la *Arthrospira* producida en el compartimento IVa y la fracción comestible de las plantas se extraerían del bucle para simular la alimentación de una persona.

El escenario II sería similar al escenario I con la única diferencia que la totalidad de la *Arthrospira* producida sería devuelta al compartimento I.

Finalmente, el escenario III, el más desfavorable, está basado en que no se alimente materia fecal al compartimento I, pero tampoco se extraiga la biomasa producida en

Capítulo 4 – Resultados y discusión

el bucle (*R. rubrum*, *Arthrospira* y plantas -fracción comestible y fracción no comestible-). Es decir, toda esta biomasa sería devuelta al compartimento I.

Utilizando las ecuaciones de los balances de materia globales del bucle MELiSSA desarrollados por Masot *et al.* (2004), se puede calcular en función de todas estas hipótesis los caudales y composición de las corrientes que entran y salen de los diferentes compartimentos que integran el bucle MELiSSA. A su vez, conocidos los ácidos grasos volátiles que salen del compartimento I (principalmente, ácido acético) y teniendo en cuenta las ecuaciones estequiométricas de crecimiento, se puede calcular la producción de *R. rubrum* que supone su consumo completo.

En la tabla 4.54 se resume la cantidad de *R. rubrum* que se formaría al consumir completamente los ácidos grasos volátiles que se producirían en el compartimento I, en función del escenario planteado.

Escenario	I	II	III
Producción de <i>R. rubrum</i> (g/día)	33.0	49.1	62.9

Tabla 4.54: Producción de *R. rubrum* que se formaría en función del escenario adoptado.

Así pues, el fotobiorreactor que desarrollará el papel de compartimento II dentro del bucle MELiSSA deberá producir en condiciones normales una cantidad de *R. rubrum* de alrededor 33 g/día, aunque deberá ser capaz de llegar a producir hasta 63 g/día, aproximadamente, en las condiciones más desfavorables para el compartimento II.

Teniendo en cuenta que de la composición de ácidos grasos volátiles producidos en el compartimento I es el ácido acético el ácido graso volátil mayoritario, se puede utilizar el modelo desarrollado en el subcapítulo 4.5 del presente trabajo para tener un valor bastante próximo del volumen requerido para el fotobiorreactor del compartimento II.

Para calcular el volumen mínimo con el cual alcanzar la productividad máxima de la tabla 4.54, primero es necesario fijar todas las variables que afectan a la iluminación, desde el punto de vista de la cantidad de radiación y también de la eficiencia de la transferencia de energía. Las principales variables que intervienen de forma determinante son:

- el diámetro de la zona iluminada, puesto que como ya se ha visto en este trabajo, la irradiancia disponible por las células disminuye de forma exponencial con la distancia radial.
- la fracción de volumen susceptible de ser iluminado respecto al volumen total (fracción de volumen iluminado, ϕ_{IL}).
- la irradiancia incidente máxima que se podrá utilizar en el reactor.

Determinación de la capacidad de iluminación

En el escalado de cualquier fotobiorreactor, el reto más importante consiste en obtener un buen rendimiento en el proceso de conversión de la energía de la radiación en el producto deseado, puesto que la disipación de la energía en forma de calor es excesiva (Hoekema *et al.*, 2006). Cuanto mayor sea la disponibilidad de luz por parte de las células, mayor velocidad de consumo de ácidos grasos volátiles se conseguirá.

La disponibilidad de luz dentro del fotobiorreactor se puede maximizar variando dos factores clave:

- a) La fracción de volumen iluminado (ϕ_{IL}): el volumen iluminado ha de ser máximo respecto al volumen total, puesto que el volumen no iluminado (volumen oscuro) se comporta como un volumen muerto en el que no existe crecimiento celular y disminuye la velocidad de crecimiento global.
- b) La atenuación de la luz: a medida que la luz va atravesando un medio participativo, como es el cultivo celular, suceden tres tipos de fenómenos:
 - Absorción: la cual produce una disminución de la intensidad de la luz.
 - Emisión: la cual aumenta la intensidad a diferentes longitudes de onda.
 - Dispersión: la cual provoca una redirección de la distribución de la energía.

El resultado global de estos tres factores resulta en que a medida que aumenta la longitud del camino óptico, la energía disponible para las células es menor. Consecuentemente, cuanto menor sea el diámetro de la zona iluminada del fotobiorreactor, mayores valores de irradiancia habrá a disposición de las células.

Teniendo en cuenta este último aspecto, sería conveniente que el futuro fotobiorreactor fuese un cilindro iluminado en que el diámetro no fuese excesivamente grande, para así obtener un buen perfil de irradiancia a lo largo de toda la sección. No obstante, el diámetro no puede ser demasiado pequeño como para necesitar una altura desproporcionada para obtener finalmente un cierto volumen. Así pues, con la finalidad de encontrar un compromiso entre la eficiencia de iluminación y la altura de la columna iluminada, se ha fijado el diámetro interno de la columna en 12 cm.

Por otro lado, hay que tener presente que será necesaria en el fotobiorreactor disponer de una zona construida con una geometría y con un material tal que permita la colocación de las diferentes sondas necesarias para el seguimiento de los parámetros básicos del cultivo (pH, pO_2 , densidad celular, etc). EL material idónea para esta pieza es el acero inoxidable AISI-316, por sus propiedades de ductilidad, resistencia y pasividad. No obstante, como el volumen comprendido en esta pieza será volumen no iluminado, este volumen, en relación al volumen total, debe ser mínimo. Así, se fija que el volumen no iluminado sea como máximo el 25% del volumen total, siendo esta cantidad un valor razonable para su finalidad sin que suponga una pérdida de eficiencia global del sistema considerable.

Finalmente, de cara a establecer las condiciones de iluminación del sistema, es necesario fijar la irradiancia incidente máxima que se podrá utilizar en el nuevo fotobiorreactor. Dada la experiencia con diferentes fotobiorreactores, en el nuevo sistema debería poderse utilizar, como mínimo, una irradiancia incidente máxima de $3000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Parámetros que deberá cumplir el fotobiorreactor	
Diámetro interno zona iluminada	0.12 m
Fracción de volumen iluminado mínima, ϕ_{IL}	0.75
Irradiancia incidente máxima	$> 3000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$

Tabla 4.55: *Parámetros tomados constantes en el cálculo del volumen del fotobiorreactor.*

En la tabla 4.55 se resumen los parámetros que condicionan la cantidad y eficiencia de iluminación del cultivo y que han sido fijados. Una vez establecida la capacidad de iluminación, el volumen del fotobiorreactor depende de la concentración de ácidos

grasos volátiles a la entrada del compartimento II y de la velocidad de dilución a la que éste opere.

Determinación del volumen mínimo del fotobiorreactor

Aplicando el modelo matemático desarrollado en el capítulo 4.6 y utilizando los parámetros de la tabla 4.55, en función de la concentración de ácidos grasos volátiles que entren en el compartimento II y la velocidad de dilución a la que opere el fotobiorreactor, el volumen mínimo requerido para alcanzar una productividad de 62.9 g/día de *R. rubrum*, consumiendo todos los ácidos grasos, es el que se resume en la tabla 4.56.

Volumen (L)		D (h ⁻¹)		
		0.04	0.08	0.12
Conc. de ácidos grasos volátiles (g C/L)	0.5	75.5	43.7	35.3
	1.0	43.9	23.4	17.1
	1.5	33.5	17.4	12.3
	2.0	28.6	14.8	10.3
	2.5	26.5	13.6	9.3

Tabla 4.56: Volumen mínimo del fotobiorreactor para alcanzar la productividad requerida más desfavorable, en función de la velocidad de dilución y de la concentración de ácidos grasos volátiles (en forma de ácido acético) consumidos. Resultados obtenidos mediante la aplicación del modelo matemático desarrollado en este trabajo.

Con los parámetros de la tabla 4.55 fijados, todos los ácidos grasos volátiles serán consumidos completamente (en el rango en que aparecen los parámetros en la tabla 4.56). Así pues, como más alta sea la velocidad de dilución, mayor será la productividad conseguida (en el rango de velocidades de dilución mostrado). La concentración de ácidos grasos volátiles en el afluente líquido del compartimento II será con mucha probabilidad igual o superior a 1 g C/L, por lo que se puede tomar este valor como concentración mínima de referencia. Por tanto, teniendo en cuenta estas consideraciones y los resultados expuestos en la tabla 4.56, un fotobiorreactor de 23.4 L (que cumpla con los requisitos fijados en la tabla 4.55),

siempre que la concentración de ácidos grasos volátiles sea igual o superior a 1 g C/L (circunstancia muy posible), a una velocidad de dilución igual o mayor que 0.08 h^{-1} la productividad conseguida será, como mínimo, la requerida. Así pues, este volumen es un buen compromiso entre la garantía de cumplir con la productividad exigida para este compartimento sin llegar a recurrir a un volumen excesivamente grande.

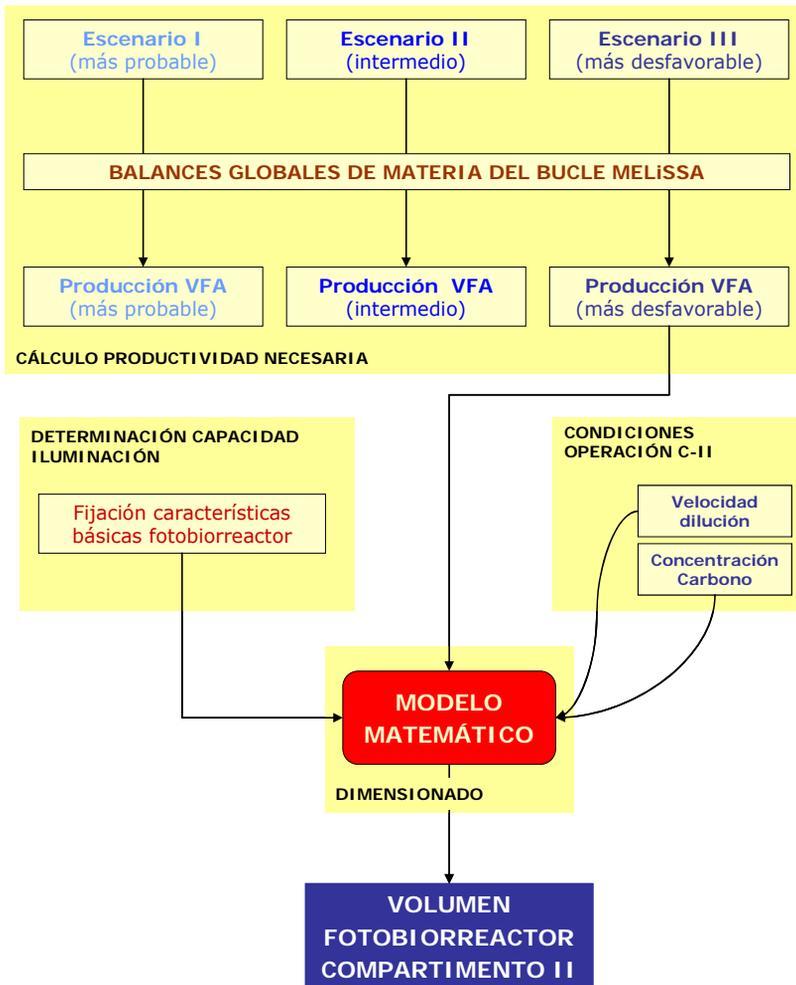


Figura 4.72: Esquema del proceso seguido para dimensionar el fotobiorreactor piloto del compartimento II.

Una de las aproximaciones hecha en el cálculo reside en que se ha considerado que los ácidos grasos volátiles consumidos son exclusivamente ácido acético. Aunque este ácido graso es el mayoritario a la salida del compartimento I, no es el único. Cualquier otro ácido graso diferente del ácido acético (ácido propiónico, ácido butírico, etc.) será consumido a una velocidad inferior, por lo que el volumen del fotobiorreactor debería ser mayor de los resultados mostrados en la tabla 4.56 para conseguir una productividad concreta. No obstante, como construyendo un fotobiorreactor de 23.4 L se conseguiría la productividad deseada a 0.08 h^{-1} y aún queda mucho margen por recorrer aumentando la velocidad de dilución, se entiende que el cálculo es suficientemente conservativo como para que con este volumen se pueda conseguir la productividad exigida aunque la fuente de carbono no sea exclusivamente ácido acético.

4.7.3. Diseño del fotobiorreactor piloto del Compartimento II

De acuerdo con los parámetros fijados en la tabla 4.55, que han servido para utilizar el modelo de crecimiento y calcular el volumen mínimo del reactor en esas condiciones, con un diámetro interno de la zona iluminada de 12 cm y una fracción de volumen iluminado del 75%, con un volumen total de 23.4 L se podría conseguir la productividad deseada en las condiciones del cálculo: irradiancia incidente igual o superior a $3000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, velocidad de dilución igual o superior a 0.08 h^{-1} y una concentración de ácidos grasos volátiles en el afluente al compartimento II igual o superior a 1 g C/L (ácido acético).

Así pues, fijando el diámetro de la columna iluminada en 0.12 m, la altura mínima del fotobiorreactor debería ser 1.6 m. En la figura 4.73 se detallan las dimensiones del fotobiorreactor piloto en un diseño preliminar. Dimensionando de forma proporcionada el cabezal y el fondo del reactor resulta un volumen final de 24.0 L, aproximadamente el volumen previamente fijado.

En cuanto al resto de parámetros fijados en la tabla 4.55 cabe decir que la fracción de volumen iluminado (75.6%) es ligeramente superior a la establecida a priori y que si se colocan unas 10 lámparas a un mismo nivel, será fácil conseguir una irradiancia

incidente máxima superior a $3000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por lo que este diseño preliminar cumple con todos los requisitos establecidos.

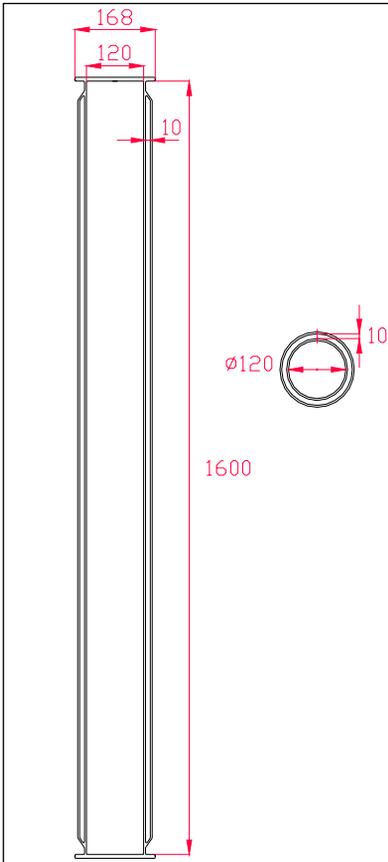
	<p>Cabezal 4.9 L</p> <p>Altura superior: 0.18 m</p> <p>Altura inferior: 0.08 m</p> <p>Diámetro superior interno: 0.16 m</p> <p>Diámetro inferior interno: 0.12 m</p>
	<p>Columna iluminada 18.1 L</p> <p>Altura: 1.6 m</p> <p>Diámetro: 0.12 m</p>
	<p>Fondo 1.0 L</p> <p>Altura: 0.08 m</p> <p>Diámetro: 0.12 m</p>
	<p>Volumen total: 24.0 L</p> <p>Volumen iluminado: 18.1 L</p> <p>Fracción volumen ilum., ϕ_{IL}: 75.6%</p> <p>Superficie iluminada: 0.60 m²</p> <p>Altura total: 1.94 m</p>

Figura 4.73: Dimensiones y esquema a escala del fotobiorreactor piloto.

Como se resume en la figura 4.73, el fotobiorreactor está formado por tres partes básicas: la columna iluminada, el cabezal y el fondo. A continuación se detallan las especificaciones y el diseño de cada una de ellas.

Columna iluminada

La columna iluminada es la única zona del fotobiorreactor donde las células pueden recibir luz. Por tanto, el volumen de esta zona debe ser máximo en relación al volumen total.



Debe ser construida en vidrio templado y disponer de una camisa por donde circulará el agua de refrigeración a 4 °C. Este requisito tiene unas implicaciones constructivas que deben ser tenidas en cuenta, como por ejemplo, es el caso de la dilatación y contracción que sufrirá esta pieza durante el proceso de esterilización.

En la figura 4.74 se esquematizan las dimensiones más relevantes de la columna iluminada.

Dimensiones:

- Diámetro interno columna: 120 mm
- Grueso de la pared vidrio: 4.5 mm
- Ancho camisa: 10 mm
- Diámetro externo: 156 mm
- Diámetro extremos: 168 mm
- Altura: 1.6 m
- Volumen interno: 18.1 L
- Superficie iluminada: 0.60 m²

Figura 4.74: Dimensiones de la columna iluminada.

En el cabezal habrá un total de 12 puertos, para alojar las diferentes sondas y entradas y salida de corrientes. Los puertos 1, 2 y 3 (figura 4.76) tienen un diámetro interno de 25 mm y están situados en el lateral del cabezal, siendo el ángulo de inserción de 90° para uno y de 135° para los otros dos (figura 4.75). Disponer de puertos laterales es conveniente puesto que puede que algunas sondas tengan que estar situadas en posición horizontal o con una cierta inclinación –sonda de densidad celular–.

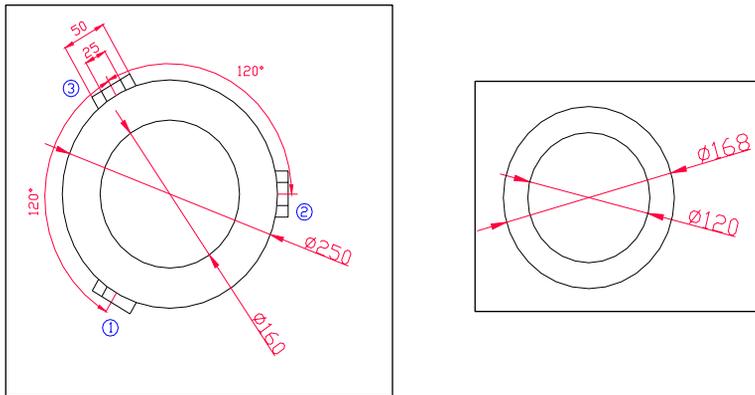


Figura 4.76: Planta superior e inferior del cabezal.

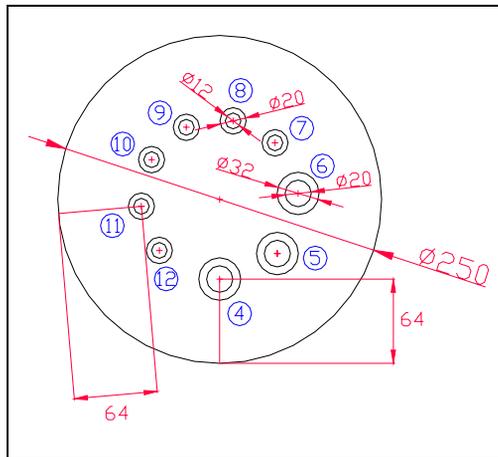


Figura 4.77: Tapa del cabezal. Distribución y dimensiones de los puertos.

En la tapa superior del cabezal habrá 9 puertos más, 3 de diámetro interno 20 mm y 6 de 12 mm. En la figura 4.77 se esquematiza la distribución de los 9 puertos y sus dimensiones. El tamaño de los puertos, diámetro interno de 12, 20 y 25 mm, es el estándar que utilizan la mayoría de empresas de biotecnología para las sondas y sensores.

Fondos

La pieza de fondos del fotobiorreactor consiste en un recipiente de acero inoxidable que está sujetado al extremo inferior de la columna iluminada y permite colocar puertos para sondas o para entrada y salida de corrientes. Habrá 7 puertos, todos ellos de 12 mm de diámetro interno (figura 4.79).

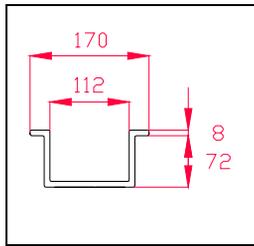


Figura 4.78: Sección de la pieza de fondos del fotobiorreactor.

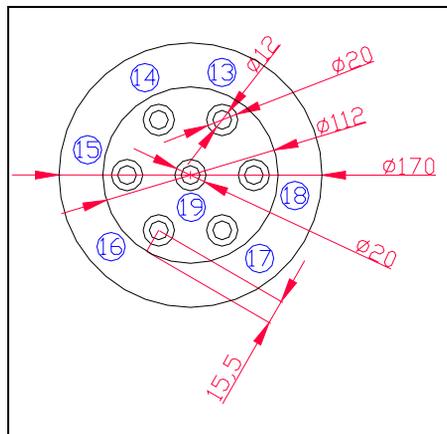


Figura 4.79: Planta de la sección de fondos, donde se aprecia la distribución de los puertos.

En la tabla 4.57 se detalla la función de los puertos del fotobiorreactor, tanto los del cabezal como los de fondos.

Situación	Núm. puerto	∅ Int. (Ext.) mm	Función
CABEZAL			
Pared	1	25 (50)	Sonda de densidad celular núm. 1
	2	25 (50)	Sonda de densidad celular núm. 2
	3	25 (50)	Sonda de pH núm. 1
Tapa superior	4	20 (32)	Sonda de pH núm. 2
	5	20 (32)	Sensor de presión
	6	20 (32)	Sonda de pO ₂
	7	12 (20)	Control de pH. Adición de ácido
	8	12 (20)	Control de pH. Adición de base
	9	12 (20)	Salida de gas
	10	12 (20)	Válvula de sobrepresión
	11	12 (20)	Salida de líquido
	12	12 (20)	Puerto toma muestras
FONDOS			
Fondos	13	12 (20)	Sonda de temperatura (Pt-100)
	14	12 (20)	Entrada líquido
	15	12 (20)	Puerto para inocular
	16	12 (20)	Sonda redox
	17	12 (20)	Entrada y purga de vapor de agua
	18	12 (20)	Entrada de gas (con difusor)
	19	12 (20)	Puerto extra

Tabla 4.57: Función, localización y características de todos los puertos.

Sistema de iluminación

Para suministrar la radiación necesaria para el crecimiento de las células se utilizarán lámparas halógenas, puesto que son las que se han utilizado en la Planta Piloto durante largo tiempo y han demostrado ser adecuadas para el funcionamiento del compartimento II.

Las lámparas halógenas serán de 12 V, 20 W y BAB 38°. Como será necesario poder variar la irradiancia incidente, existirá la capacidad de variar el voltaje suministrado a las lámparas.

A lo largo de la columna iluminada se colocarán 20 filas de lámparas, en las que en cada una habrá 10 lámparas rodeando la columna de cristal. Así pues, habrá un total de 200 lámparas rodeando la columna iluminada, que consumirán un total de 4000 W de energía. Esta configuración es la que permite el mayor número de lámparas de este tipo alrededor del fotobiorreactor.

Para obtener 4000 W de corriente continua, será necesario un transformador eléctrico que convertirá la corriente alterna a 220 V en corriente continua. El voltaje de la corriente continua, que estará entre 0-12 V, dependerá del valor de una entrada analógica de 4-20 mA.

Las lámparas estarán montadas en un soporte mecánico, construido en acero inoxidable AISI-304, que alojará las lámparas en una posición fija. Este soporte tendrá la capacidad de poder ser retirado del fotobiorreactor cuando sea necesario, por ejemplo, para llevar a cabo el proceso de esterilización del fotobiorreactor, limpieza, cambio de lámparas, etc.

El suministro de energía lumínica tiene un rendimiento bajo y la mayor parte se pierde en forma de calor. El aire que rodea la columna iluminada se calienta debido a

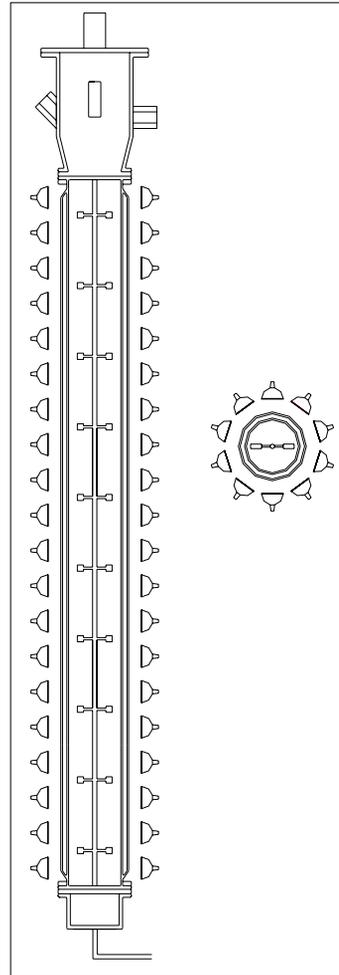


Figura 4.80: sistema de iluminación del fotobiorreactor.

las lámparas y, por convección, transmite esta energía a las paredes de la columna iluminada. Esto se traduce que el sistema de refrigeración del fotobiorreactor tiene que trabajar en exceso para mantener la temperatura constante. Para evitarlo, se instalará un sistema de extracción del aire caliente que rodea a las lámparas. Esta extracción de aire caliente puede consistir en un ventilador eléctrico, que haga entrar el aire por la parte inferior del reactor y desplace el aire caliente en sentido ascendente, y un extractor de aire situado en la parte superior del reactor, que lo expulsará fuera del laboratorio.

Circuito de gases del fotobiorreactor

La principal característica del circuito de gases de este fotobiorreactor es el hecho de que tiene que ser cerrado. Esta particularidad viene dada por el hecho de que el bucle MELISSA, en su globalidad, no intercambia materia con el exterior. Así pues, el compartimento II no puede expulsar gas que no vaya al compartimento III, o a algún otro compartimento del bucle, ni admitir gas que no proceda del compartimento I. Además, para que el metabolismo de las células de *R. rubrum* sea el adecuado, es necesaria la ausencia de oxígeno a la vez de la presencia de luz. Finalmente, si existe un cierto arrastre de ácidos grasos volátiles por la fase gas, este gas debe ser realimentado en el cultivo con la finalidad de que se consuman los ácidos grasos volátiles en su totalidad.

Para cumplir con todos estos objetivos se ha diseñado un circuito cerrado de gases, en el que el gas es recirculado a través del cultivo. El diseño del circuito de gases así como todos otros detalles del diseño del compartimento se pueden observar en el diagrama de ingeniería (Anexo 8.1, página 351). A continuación se describe el funcionamiento del circuito de gases, siguiendo el camino que hará el gas a través de él. El gas abandona el fotobiorreactor a través de la salida que existe en el cabezal metálico y pasa a través del intercambiador de calor E-201 (figura 4.81), donde además de la humedad, parte de los ácidos grasos volátiles que arrastra el gas son condensados y devueltos al cultivo.

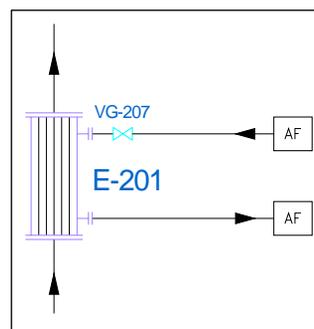


Figura 4.81: Esquema del condensador E-201 del PID.

Después del condensador, el gas atraviesa el filtro F-201 (figura 4.82) el cual se encuentra duplicado (A y B) con el objetivo de cambiar de filtro cuando uno de los dos se colmate, operación frecuente en este tipo de cultivo. Así, mientras un filtro está en funcionamiento, el otro se puede desmontar, limpiar y preparar para su próximo uso. Este cambio de unidad operativa está previsto que sea de forma automática, puesto que la presión es medida antes del filtro (en el cabezal del fotobiorreactor) y también después del filtro (en el tanque T-204). La colmatación del filtro se podría

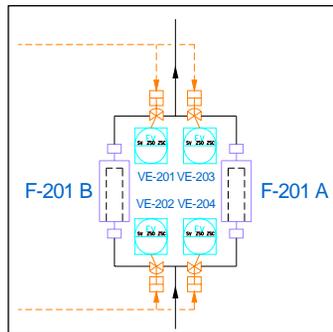


Figura 4.82: Esquema de los filtros F-201 (A y B) del PID.

detectar en el momento en que la presión de cabecera del fotobiorreactor aumentase de forma considerable sin con ello afectar a la presión de después del filtro. Tan pronto como los controladores detectasen esta situación, se cambiaría la unidad operativa del F-201A al F-201B (o al revés) mediante el conjunto de electroválvulas VE-201, VE-202, VE-203 y VE-204. El filtro F-201 actúa como una barrera de esterilidad y, después de este punto, empieza la parte no estéril del circuito de gases.

Después de atravesar el filtro F-201, las válvulas VD-201 y VD-202 permiten abrir el circuito de gases y descargar gas a la atmósfera si es necesario, por ejemplo, en caso de que el compartimento esté trabajando en circuito abierto (no conectado a los compartimentos I y III). La posición normal de las válvulas, VD-201 cerrada y VD-202 abierta, permiten la operación del compartimento en circuito cerrado.

En el tanque pulmón T-204 (figura 4.83) se estabiliza la presión del gas a la salida del fotobiorreactor, se mide y, en caso de sobrepresión, se alivia fuera del compartimento II. Dependiendo del valor de la presión del interior del tanque, se pueden desencadenar dos acciones: (1) si la presión es ligeramente superior a la presión de consigna, la válvula VC-207 se abre y el gas se deriva hacia el compartimento III. Esto sucederá de forma habitual siempre que se introduzca gas en el circuito o bien cuando el tanque T-101 se rellene de medio de cultivo fresco. No obstante, (2) si el valor de la presión del interior del tanque T-204 fuese considerablemente superior al valor de consigna, hecho que indicaría que algún problema está sucediendo, se abriría la válvula VC-208 y el gas sería descargado en la atmósfera. En esta fase de diseño, la presión de consigna del tanque T-204 está alrededor de 0.1 kg/cm². Sin embargo,

este valor así como las consignas a las que se abrirán las válvulas VC-207 y VC-208 se determinarán de forma mucho más precisa después de optimizar el funcionamiento del sistema.

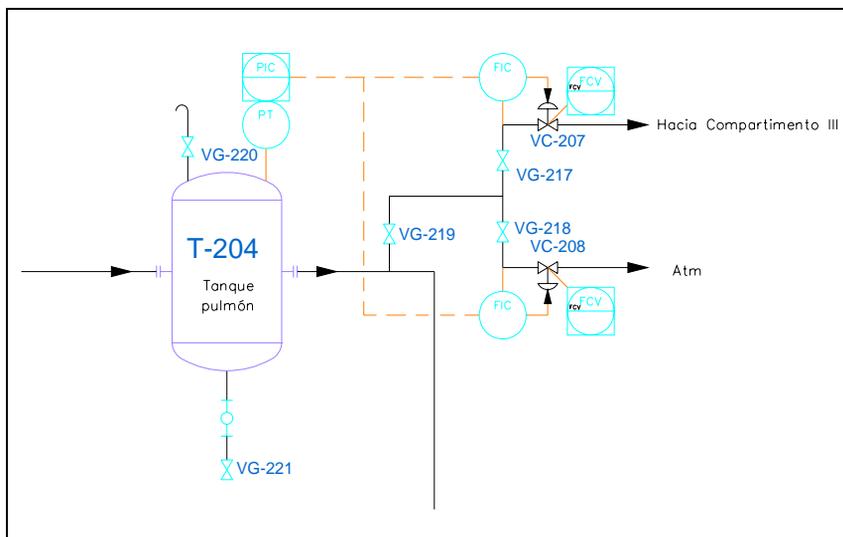


Figura 4.83: Estabilización de la presión y control de la descarga de gas, que puede ser al compartimento III o bien al exterior en caso de emergencia.

En el circuito se puede alimentar gas del exterior, el cual puede provenir del compartimento I o bien puede ser CO₂ y/o argón de botella (figura 4.84). El punto de conexión es próximo a la aspiración del compresor, que es la zona donde la presión es la más baja del sistema. El argón es necesario para mantener la presión en el circuito a la vez que se mantiene la atmósfera anaerobia. El CO₂ puede ser necesario para incrementar la presión parcial de este gas en función del tipo de experimento que se esté llevando a cabo o para disminuir la duración de las fases de latencia en los experimentos en discontinuo. Cada conexión de gas tiene un regulador de caudal másico que permite conocer y ajustar el caudal de cada gas de forma independiente.

El gas externo introducido se mezcla con el gas que procede del tanque T-204 (la válvula de retención VK-202 impide el paso del gas hacia el tanque T-204) y con el gas que sale del circuito de análisis del gas. La mezcla pasa por el compresor K-201, el cual aumenta la presión por encima de la presión del tanque T-101. El compresor

tiene una recirculación de gas que permite controlar la presión del gas de salida. El tanque T-203, situado en la salida del compresor (figura 4.85), permite mantener el gas acumulado a una cierta presión constante. En caso de que esta presión baje o suba por encima del valor de la consigna, el controlador de presión del tanque T-203 cierra o abre respectivamente la válvula de control VC-203, haciendo que el caudal de gas que recircula alrededor del compresor sea mayor o menor. En caso de sobrepresión en el tanque T-203, la válvula de seguridad VG-215 se abriría aliviando la presión al exterior.

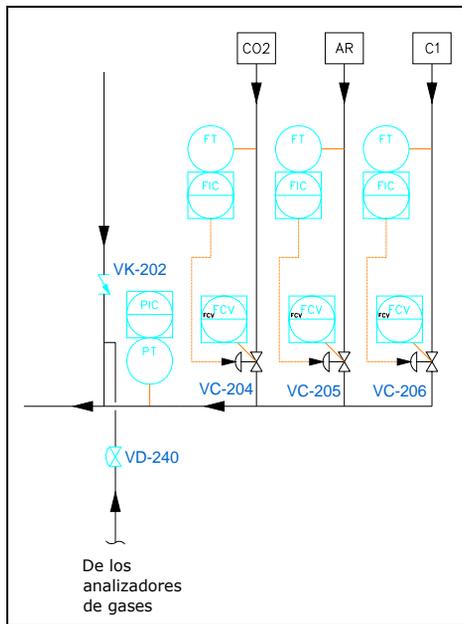


Figura 4.84: Detalle de la entrada de gas externo en el circuito de gases, el cual puede provenir del compartimento I, o bien ser CO₂ i/o argón.

El gas, una vez presurizado, se acumula en el tanque T-203 de donde se envía hacia el fotobiorreactor a caudal constante, regulado mediante la válvula de control VC-202 comandada por un controlador másico de caudal. Además, el tanque T-203 tiene la función de suministrar gas a los tanques T-101 (tanque de alimentación) y T-301 (tanque de descarga) cuando sus respectivas presiones descienden por debajo de un valor de consigna. En consecuencia, las fases gas de los tanques T-203, T-101 y

T-301 están conectadas, evitando así la necesidad de introducir gas del exterior cuando los tanques T-101 o T-301 son vaciados. Los valores de consigna de la presión de los diferentes tanques y del fotobiorreactor serán determinados de tal manera que permitan la circulación del líquido del tanque T-101 al fotobiorreactor, y de éste hasta el tanque T-301.

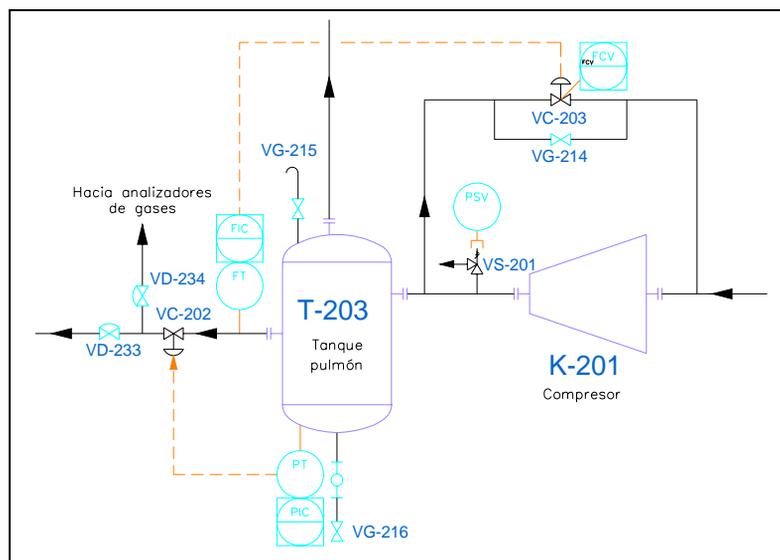


Figura 4.85: Detalle del compresor K-201 y del lazo de control de la presión a la salida. El tanque T-203 actúa como un pulmón de gas, a presión constante, que alimenta gas donde es requerido.

Cuando los tanques T-101 y/o T-301 son llenados, el gas del interior del tanque desplazado por el líquido es desviado al tanque T-204, evitando de esta manera la pérdida de gas que puede ser rico en ácidos grasos volátiles. Operando de esta manera, el cierre de la fase gas en el bucle MELiSSA está asegurado, pues la única entrada en el compartimento II procede del compartimento I y la única salida se dirige al compartimento III.

Una fracción del gas del tanque T-203 puede ser derivada hacia el circuito de análisis de gases, el cual estaría formado por un analizador de CO₂ y un cromatógrafo de gases, ambos en línea. El gas del circuito de análisis, es devuelto al circuito de gases del fotobiorreactor, concretamente en la aspiración del compresor K-201. El caudal de

gas necesario para llevar a cabo el análisis es constante y despreciable respecto al caudal de gas del circuito de gas del fotobiorreactor.

El gas, antes de entrar en el fotobiorreactor, es filtrado. Este proceso se lleva a cabo en dos fases, primero el gas atraviesa el prefiltro F-202, construido con polipropileno y con un tamaño de paso inferior a $0.65 \mu\text{m}$, y después pasa a través del filtro F-203, construido con teflón con un tamaño de paso inferior a $0.22 \mu\text{m}$. Después de esta filtración del aire, el gas es alimentado por la parte inferior del fotobiorreactor y repartido mediante un difusor.

Sistema de toma de muestras de líquido

La toma de muestra en un fotobiorreactor como el del compartimento II, con un cultivo que se contamina fácilmente, es crítica, puesto que se utiliza muy a menudo y no debe poner en peligro la esterilidad del sistema.

Por esta razón habrá dos sistemas de toma de muestras, una manual y otra automatizada. La toma manual permitirá extraer medio de cultivo en la parte inferior del fotobiorreactor y estará conectada a una línea de vapor fluyente para poder esterilizar los tubos antes de tomar la muestra (figura 4.86). Además, habrá un sistema automatizado de toma de muestras de líquido libre de células, el cual será analizado de forma automática mediante un cromatógrafo de gases. Esta muestra será tomada o bien del interior del fotobiorreactor o bien del tubo de salida de cultivo del reactor, en función del sistema comercial que finalmente se adopte.

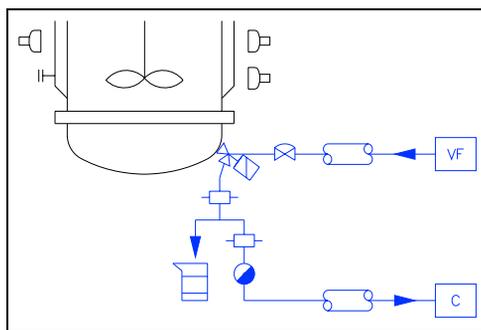


Figura 4.86: Esquema del sistema de toma de muestra manual de cultivo del fotobiorreactor, conectado a una línea de vapor fluyente para esterilizar los tubos antes de extraer la muestra.

4.7.4. Dimensionado y diseño de los equipos auxiliares

El compartimento II está formado por el fotobiorreactor y el resto de equipos que permiten a éste operar de forma continua. Estos equipos son principalmente, el tanque de alimento y el tanque de descarga de medio, aunque también existen varios depósitos pulmón de gas, los filtros que aseguran la esterilidad del sistema así como las conducciones de los circuitos de líquido y de gas que conectan los tres componentes básicos.

Depósito de alimento

El tanque de medio de entrada (T-101 en el diagrama PID) debe tener una capacidad suficiente como para permitir la autonomía del reactor durante 48 horas como mínimo. Así pues, como el caudal máximo de medio de cultivo fresco es 4.5 L/h (cuando el fotobiorreactor está operando a 0.18 h^{-1} , máxima velocidad de dilución prevista), la capacidad del tanque se ha fijado en 250 L. Sus dimensiones serán 0.70 m de diámetro y 0.70 m de altura y estará construido en acero inoxidable (AISI-316).

El depósito tendrá una camisa por la que circulará un fluido refrigerante que mantendrá el medio a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Un agitador mecánico mantendrá el medio agitado y evitará que precipiten algunas sales. Además, será necesario que el tanque tenga una sobrepresión y que ésta sea el mismo gas recirculado en el reactor y procedente del bucle cerrado de compartimentos.

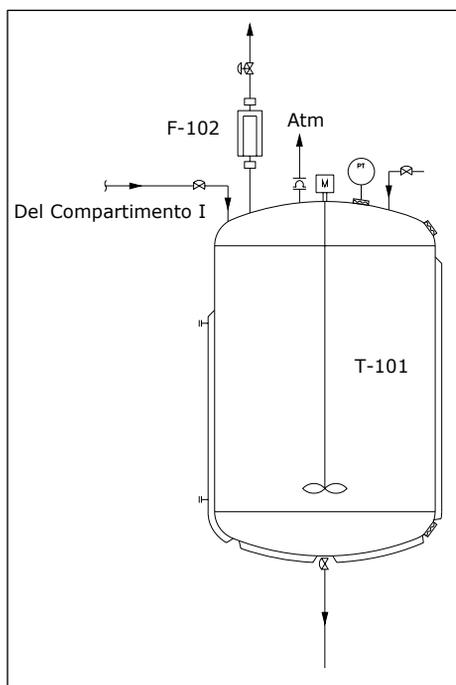


Figura 4.87: Detalle del tanque de alimento fresco, T-101.

presentes en la fase gas (como consecuencia del equilibrio dinámico con los ácidos grasos volátiles del líquido) no se escapan al exterior.

4.7.5. Instrumentación y diseño de los lazos de control

Un sistema tan complejo como el Compartimento II sólo puede operar de forma óptima y segura si los parámetros físicos y químicos más importantes están regulados y controlados. Es el caso de la temperatura, pH, presión, concentración de células, nivel de oxígeno y los caudales de líquido y de gas.

A continuación se detallan los lazos de control presentes en cada uno de los equipos: tanque de alimento (T-101), fotobiorreactor y tanque de descarga (T-301).

Depósito de alimento

Los parámetros que se mantienen controlados en el tanque de medio fresco (T-101) son los siguientes:

- Presión en cabecera
- Temperatura del medio fresco
- Nivel de líquido

En la figura 4.89 se esquematiza la instrumentación y los lazos de control necesarios para mantener el tanque de alimento operando en condiciones óptimas.

Lazo de control de presión en cabecera en el tanque T-101

Como se ha descrito anteriormente, la presión de este depósito es la fuerza que impulsa el líquido desde este tanque hasta el fotobiorreactor. De este modo se evita la necesidad de utilizar bombas, lo que simplifica extremadamente el proceso de esterilización, reduce el riesgo de contaminación y el sistema es mucho más robusto. Puesto que para que salga líquido del tanque es necesaria una cierta sobrepresión en el interior, la presión en este depósito es un parámetro clave en el funcionamiento global del Compartimento II. La presión en cabecera del tanque se controla haciendo entrar gas o bien expulsándolo en función de las variaciones en el nivel de líquido.

La salida de líquido de este depósito, que es el líquido que se alimenta al fotobiorreactor, se regula mediante una válvula de control (la VC-103) la cual es

comandada automáticamente en función de la medida de caudal de un caudalímetro másico. Este lazo de control es crítico puesto que es el responsable de la regulación y ajuste de la velocidad de dilución del fotobiorreactor.

Cuando la presión en el tanque T-101 disminuye, el controlador de presión actúa sobre la válvula de control VC-101A abriéndola y permite que entre gas en el depósito. Este gas que entra puede ser o bien argón o bien gas procedente del depósito pulmón T-203, que es gas del circuito de gases del fotobiorreactor.

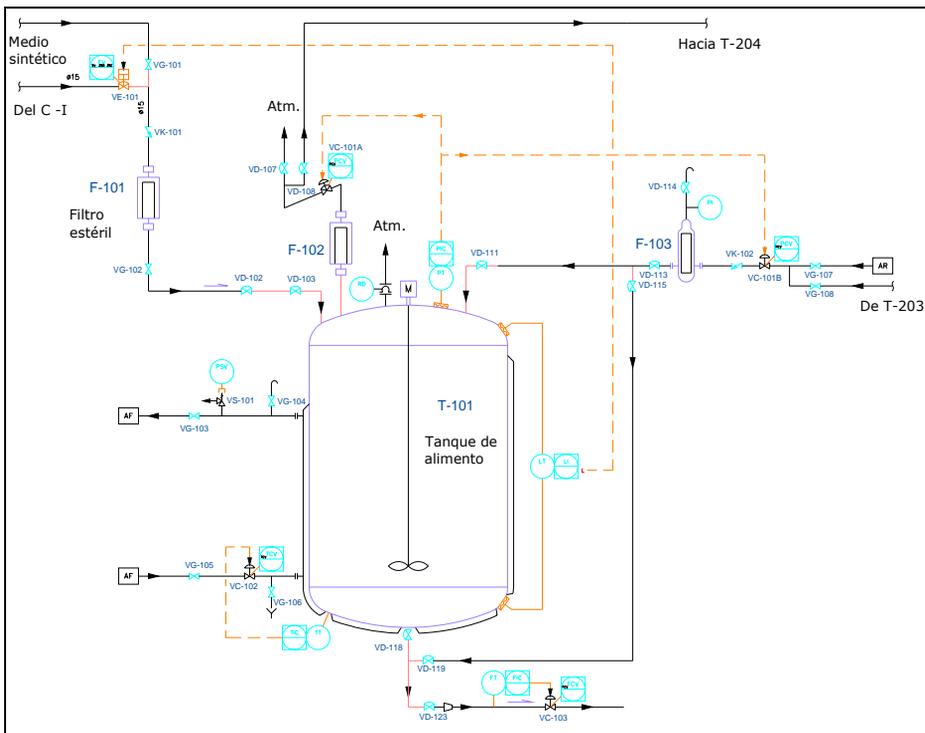


Figura 4.89: Detalle de los lazos de control de presión, nivel, temperatura y caudal másico del tanque de alimento (T-101).

Si la presión en el tanque de alimento aumenta, el controlador actúa sobre la válvula de control VC-101B y el gas es expulsado del tanque. Mediante las válvulas VD-107 y VD-108 es posible derivar el gas expulsado hacia la atmósfera o hacia el tanque pulmón T-204, respectivamente. Derivar este gas al tanque T-204 quiere decir introducir el gas excedente del tanque T-101 en el circuito de gases del

fotobiorreactor, evitando así la posible pérdida de ácidos grasos volátiles que estuviesen en la fase gas en equilibrio con la fase líquida (medio con concentraciones elevadas de ácidos grasos volátiles).

En la parte superior del tanque de alimento debe haber instalado un disco de ruptura el cual se rompe si la presión del interior excediese de 2 kg/cm^2 , liberando a la atmósfera los gases del interior. Esta situación podría ocurrir si, por ejemplo, el filtro F-102 se colmatase y no se tomara ninguna acción correctora a tiempo.

Lazo de control de temperatura en el tanque T-101

Al ser el objetivo del tanque T-101 almacenar el medio de cultivo fresco para poder ir alimentando de forma ininterrumpida el fotobiorreactor, es necesario que el medio fresco se mantenga inalterado. Para contribuir a este objetivo, el depósito se mantendrá refrigerado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. La temperatura será medida mediante una sonda Pt-100 y se enviará la señal al controlador, el cual actuará sobre la válvula de control VC-102. Esta válvula regula el paso de líquido refrigerante a través de la camisa del tanque (figura 4.89).

Lazo de control de nivel de líquido en el tanque T-101

El nivel de líquido del tanque T-101 se mide por medio de dos sensores de presión situados uno en la base del depósito y el otro en la parte superior. La diferencia entre las dos lecturas de presión es proporcional al volumen de líquido en el interior del tanque (figura 4.89).

Si los compartimentos I y II están operando interconectados y el tanque T-101 se llena completamente de líquido, el controlador de nivel cerrará la electroválvula VE-101 para prevenir cualquier accidente. En este caso, el sistema central de control deberá parar el caudal de líquido que se envía del compartimento I al compartimento II.

Fotobiorreactor

Los parámetros que se mantienen controlados en el fotobiorreactor son los siguientes:

- Presión en cabecera
- Temperatura del cultivo

- pH
- Concentración de células
- Nivel de líquido
- Caudal de líquido de entrada y salida
- Caudal de gas de entrada, salida y recirculación

Además, existen parámetros que aunque no son controlados, se monitorizan. Es el caso del potencial redox, la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo (pO_2) y la concentración de ácidos grasos volátiles en el gas del circuito de gases.

En la figura 4.90 se pueden observar los lazos de control presentes en el fotobiorreactor.

Lazo de control de presión en cabecera en el fotobiorreactor

La presión, tanto en la cabecera del fotobiorreactor como en el circuito de gases, es un parámetro crítico, puesto que incrementos o disminuciones de presión en relación al punto de consigna pueden producir problemas y disfunciones del sistema global, poniendo también la esterilidad del sistema en peligro. Por este motivo, la presión debe de estar controlada de forma precisa en todo momento.

En la cabecera del fotobiorreactor hay un sensor de presión instalado con un indicador de presión, el cual permite comprobar visualmente la presión de cabecera (operación muy práctica durante el proceso de esterilización).

El gas que sale del fotobiorreactor atraviesa el condensador donde se retiene la humedad del gas así como una fracción de los ácidos grasos volátiles que lleva. El gas que sale del condensador pasa por el filtro F-201, el cual separa la zona estéril de la zona no estéril del circuito de gases. El gas, una vez a superado el filtro, se conduce al tanque pulmón T-204, donde la presión se estabiliza y se mide.

Como se ha explicado antes, el filtro F-201 está duplicado con el fin de cambiar de unidad operativa cuando una de ellas se colmata. Este cambio es automático y se detecta cuando la diferencia de presión entre la presión del tanque T-204 y la presión de cabecera del fotobiorreactor es superior a un cierto valor. Llegado este caso, el controlador actúa sobre las electroválvulas VE-201, VE-202, VE-203 y VE-204 para aislar el filtro colmatado y dejar que el gas pase por la unidad de recambio. De este modo, siempre hay una unidad de filtración trabajando en buenas condiciones y

cuando se colmata, las operaciones de mantenimiento se pueden acometer con facilidad.

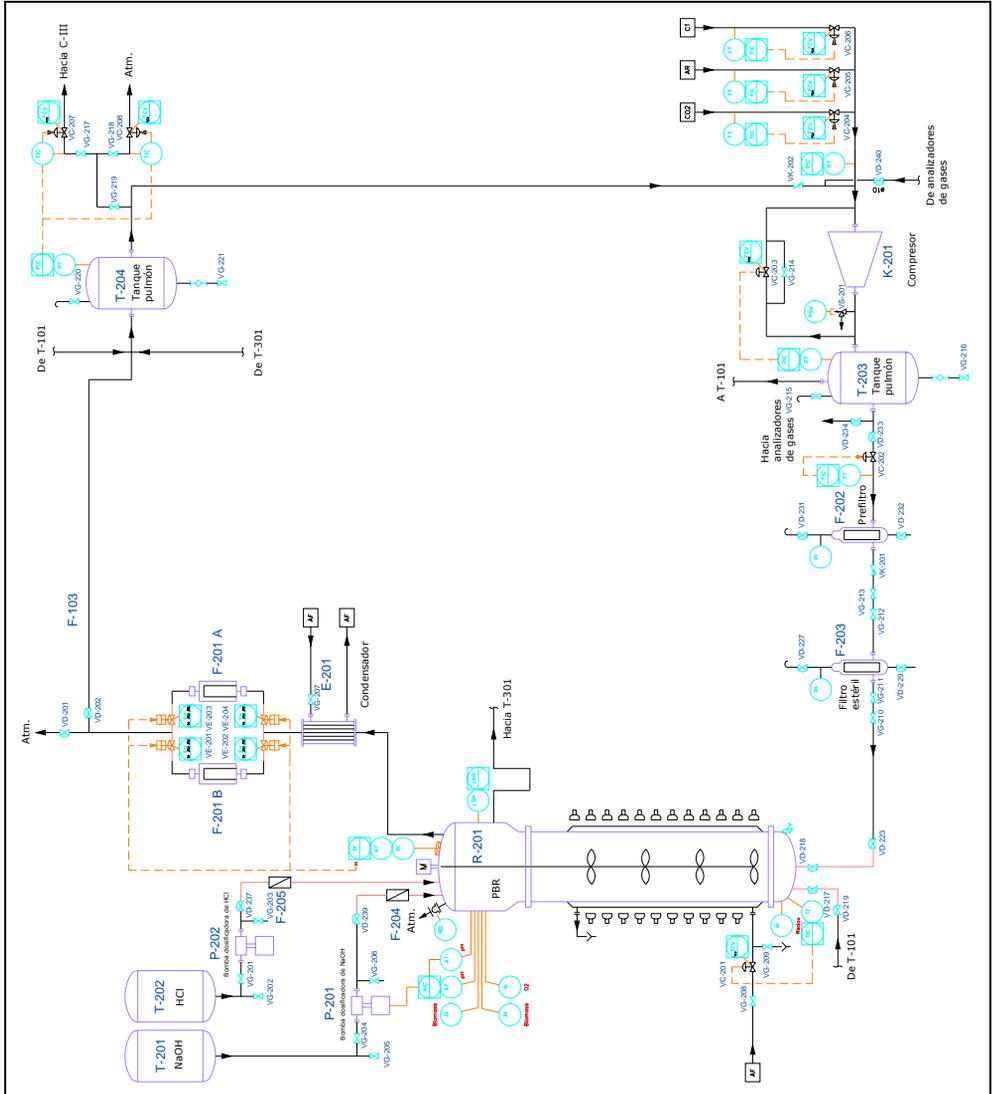


Figura 4.90: Detalle de los lazos de control del fotobiorreactor.

Si se diese el caso de que las dos unidades de filtración (F-201 A y B) estuviesen colmatadas, la presión en el interior del fotobiorreactor aumentaría hasta que el sistema de control actuase, limitando el caudal de gas de entrada. Si aún así no fuese suficiente, la presión aumentaría hasta llegar al valor nominal del disco de ruptura, el cual cedería y aliviaría el gas al exterior.

En el tanque pulmón T-204, el gas procedente del fotobiorreactor se mezcla con el gas proveniente de los tanques de alimentación (T-101) y de descarga (T-301). En el tanque T-204 la presión se controla descargando gas de acuerdo con su consigna de presión. En este lazo de control de presión, existen dos valores de alarma, por los que se envía el gas excedente a dos destinos diferentes. Si la presión del tanque es ligeramente superior a la presión de consigna, el controlador ajustará la presión abriendo la válvula de control VC-207. Así pues, este gas excedente sería derivado hacia el Compartimento-III. En la operación habitual de este compartimento, cuando estén interconectados los compartimentos I, II y III, esta situación se debe dar con más o menos frecuencia. No obstante, podría darse algún problema que hiciese que la presión dentro de este compartimento fuese aumentando de forma global. En este caso, si la presión fuese considerablemente superior a la presión de consigna, con tal de no comprometer la operación del Compartimento III, el controlador abriría la válvula de control VC-208, expulsando por tanto el gas a la atmósfera. Esta operación sería de emergencia y no debería ocurrir después de la puesta en marcha del sistema.

El gas del tanque T-204 puede ser mezclado con una adición externa de gas si es necesario. Este gas puede ser gas procedente del Compartimento I, o gases técnicos como argón o CO₂. Cada una de estas tres conexiones de gas tiene su caudalímetro másico para medir y ajustar el caudal deseado.

Una vez mezclados los gases de la recirculación con posibles gases externos, la presión del gas se aumenta por medio del compresor K-201. Como es conveniente que los compresores estancos trabajen a caudal volumétrico fijo, se ha implementado un circuito de recirculación que permite regular el caudal de gas comprimido. El gas que sale del compresor se acumula en el tanque pulmón T-203, donde se estabiliza la presión, se mide y se controla. El controlador de presión actúa sobre la válvula de control VC-203, situada en el circuito de recirculación del compresor. Si se cierra ligeramente la válvula VC-203, se disminuye el caudal de recirculación alrededor del compresor, por lo que se envía un caudal mayor de gas al tanque T-204 y aumenta la presión en éste. Y al revés, si se abre ligeramente la válvula VC-203, la cantidad de

gas que recircula alrededor del compresor es mayor y, al entrar menos gas en el tanque pulmón, la presión disminuye (si continuamente está saliendo gas hacia el reactor, que es lo habitual). Así pues, actuando sobre la válvula de control situada en la recirculación del compresor se logra mantener la presión constante en el tanque pulmón T-204. En la salida de gas de este tanque, existe un caudalímetro másico que, en función de la medida, el controlador actúa sobre la válvula de control VC-202 regulando el caudal de gas enviado al fotobiorreactor. Con estos dos últimos lazos de control, se garantiza que en el fotobiorreactor entre el caudal de gas necesario y a la presión requerida.

Si en el tanque de alimento (T-101) o en el de descarga (T-301) se necesita gas extra para compensar la presión (por ejemplo, porque se estén vaciando), este gas se envía desde el tanque T-203, que es donde el gas tiene la presión más elevada dentro de todo el circuito de gases del compartimento II.

Lazo de control de temperatura en el fotobiorreactor

Al estar el fotobiorreactor rodeado de lámparas, existe una gran cantidad de calor que es necesario eliminar del sistema. Para ello, el aire caliente que rodea las lámparas será desplazado en sentido ascendente y expulsado fuera del laboratorio. No obstante, habrá que ajustar la temperatura del cultivo a la temperatura de consigna. Para ello, la temperatura del cultivo se medirá en la base del fotobiorreactor mediante una sonda Pt-100 y en función de la medida el controlador actuará sobre la válvula de control que regula el paso de agua fría (4 °C) a través de la camisa de la columna iluminada del fotobiorreactor.

Lazo de control de pH en el fotobiorreactor

El pH del cultivo es necesario que sea mantenido constante dentro de un margen estrecho de valores. Por este motivo, habrá dos sondas de pH en el fotobiorreactor, una en el cabezal y la otra en la base. Ambas sondas serán retráctiles para permitir que puedan ser extraídas y reparadas en caso de que den problemas. Si las lecturas de las dos sondas son muy diferentes entre sí, se deberá analizar qué sonda es la que mide bien y proceder a extraer la otra. En función del valor de pH medido, el controlador actuará sobre la bomba de ácido (HCl) o sobre la de base (NaOH) mediante una señal 4-20 mA. La base estará almacenada en el tanque T-201 y el ácido en el tanque T-202.

Lazo de control de concentración de células en el fotobiorreactor

En el cabezal del fotobiorreactor hay instaladas dos sondas retráctiles de concentración de biomasa para seguir la densidad celular del cultivo. Como la concentración de células es un parámetro extremadamente importante para la operación del Compartimento II, e incluso para la globalidad del bucle MELISSA, esta sonda está duplicada. Habrá que estudiar algún sistema de limpieza de la sonda en el interior del cultivo, para que no se adhieran agregados de células e inutilicen la sonda, si el proveedor no lo tiene previsto. Una solución sería una pequeña línea de gas que impulsase gas de forma intermitente contra la superficie de la sonda y no permitiese la fijación permanente de ninguna partícula.

El Sistema de Control del bucle MELISSA (MCS) recibirá la señal proporcional a la concentración de células y actuara sobre las variables operacionales del compartimento, como variar la intensidad de iluminación o la velocidad de dilución, con la finalidad de alcanzar los objetivos fijados para este compartimento.

Lazo de control de nivel de líquido en el fotobiorreactor

En este lazo de control no se utiliza la electrónica, simplemente se controla el nivel de líquido por gravedad. Esto requiera que el fotobiorreactor y el tanque de descarga T-301 estén situados convenientemente y que las presiones se mantengan constantes.

El nivel de líquido en el fotobiorreactor se controla mediante una combinación de la gravedad, la presión y un sello hidráulico situado en el tubo de salida de líquido del fotobiorreactor. La presión en el fotobiorreactor y en el tanque deben ser prácticamente iguales, con un ligero incremento (un $\sim 2\%$, pero inferior que la presión requerida para superar el sello hidráulico) en el lado del fotobiorreactor. El nivel máximo de líquido en el tanque de descarga debe de estar situado ligeramente por debajo del nivel de líquido del fotobiorreactor. Así, se garantiza que cuando el líquido alcanza el tubo de salida, es inmediatamente desplazado en dirección el tanque T-301.

La línea de salida de líquido del fotobiorreactor tiene un tramo en forma de "U" en la que el líquido que rebosa del fotobiorreactor es retenido sellando el gas de dentro y convirtiéndose en una barrera entre el fotobiorreactor y el tanque T-301.

Naturalmente, cualquier sobrepresión hidráulica o de gas dentro del fotobiorreactor superior a la presión hidrostática de las columnas en forma de "U" del sello hidráulico

lo desbordará. No obstante, para asegurarse que el nivel de líquido se mantiene constante, tal vez sea necesaria la instalación de un sensor de nivel que dispare una alarma de nivel máximo en caso de que el sello hidráulico se desborde.

La experiencia con este tipo de control de nivel en el Compartimento IV ha mostrado que el sello hidráulico es un sistema fiable y seguro mientras la presión se mantenga constante.

Lazo de control del caudal de líquido de entrada y salida en el fotobiorreactor

El medio fresco circula del tanque T-101 hasta el fotobiorreactor gracias a que la presión es superior en el tanque. En la conducción del líquido entre los dos equipos se ha instalado un caudalímetro másico que, en función del valor medido, el controlador actúa sobre la válvula de control VC-103 regulando el caudal que circula. Como no existen sistemas mecánicos para impulsar el líquido, el riesgo de contaminación se reduce drásticamente, las células que se extraen del fotobiorreactor no se dañan y se elimina la posibilidad de avería de los equipos mecánicos. El sistema propuesto es sencillo, no pone en riesgo la esterilidad del sistema y es extremadamente preciso.

Como el nivel de líquido se mantiene constante en el fotobiorreactor, la misma cantidad de líquido que entra en el fotobiorreactor, rebosa y es acumulado en el tanque de descarga.

Depósito de descarga

Los parámetros que se mantienen controlados en el tanque de descarga (T-301) son los siguientes:

- Presión en cabecera
- Temperatura del líquido
- Nivel de líquido

Lazo de control de presión en cabecera en el tanque T-301

Un sensor de presión situado en la cabecera del tanque de descarga medirá la presión en cabecera y, en función del valor, el controlador de presión actuará sobre las válvulas de control VC-301 y VC-302.

La válvula VC-302 se abre cuando se detecta sobrepresión en el tanque. El gas excedente puede ser derivado hacia el tanque pulmón T-204 (situado en el circuito de gases del fotobiorreactor) o aliviado a la atmósfera.

La válvula de control VC-301 regula la entrada de gas en el tanque, la cual es necesaria cuando la presión en el interior es inferior a la presión de consigna. El gas entrante puede proceder del tanque T-203 o bien ser argón.

Todo el gas que el tanque de descarga intercambia pasa por el filtro F-301, asegurando así la esterilidad del tanque.

Como medida de seguridad, en la parte superior del tanque hay instalado un disco de ruptura, el cual aliviaría el gas del interior a la atmósfera en caso de sobrepresión extrema (superior a 2 kg/cm²).

En la figura 4.91 se esquematiza la instrumentación y el lazo de control de presión en cabecera en el tanque de descarga.

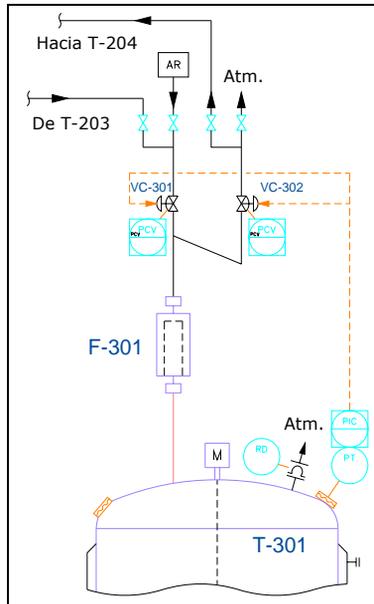


Figura 4.91: Detalle del lazo de control de presión en cabecera del tanque de descarga (T-303).

Lazo de control de temperatura en el tanque T-301

La temperatura del líquido del interior del tanque es medida mediante una sonda Pt-100. El controlador recibe la señal de la sonda y actúa sobre la válvula que regula el paso de líquido refrigerante a través de la camisa del depósito.

Lazo de control de nivel de líquido en el tanque T-301

El nivel de líquido es medido en el tanque mediante dos sensores de presión situados uno en la cabecera del depósito y el otro en su base. La diferencia entre las señales de los dos es proporcional al nivel de líquido que hay en el interior del tanque.

4.7.6. Sistema de esterilización del fotobiorreactor

La esterilización de todos los equipos se lleva a cabo presurizando el sistema con vapor de agua fluyente, a 121 °C y 1.2 atm. El tiempo de esterilización depende del tiempo necesario para que todas las partes lleguen a la temperatura de esterilización y también de si quedan restos de líquido en el interior o no. En cualquier caso, 20 minutos es el tiempo mínimo que hay que mantener cualquier parte a la temperatura y presión indicada para considerar que ha quedado estéril. En el diagrama PID (Anexo 8.1, página 351) se pueden observar los circuitos de vapor que permiten esterilizar los diferentes equipos y las conexiones.

El procedimiento de esterilización puede estar programado en los controladores o bien llevarse a cabo de forma manual. En cualquier caso, todas las líneas de vapor necesarias para esterilizar los equipos han sido contempladas. Todos los equipos se han dividido en zonas independientes, las cuales son esterilizadas de forma independiente para garantizar la eficacia del proceso. En cada una de estas zonas, existe una salida de vapor fluyente y un purgador de vapor que actúa a modo de trampa para los condensados.

Como norma general, para obtener un resultado óptimo, es conveniente introducir el vapor por el punto más alto del equipo y recoger los condensados en el punto más bajo.

En los puntos en que la configuración espacial tiene una importancia crítica, se ha esquematizado detalladamente en el diagrama PID mostrando la configuración tridimensional.

Durante la operación de esterilización del sistema y dado que el reactor es de cristal, se prevé colocar una camisa externa metálica alrededor de la columna iluminada del reactor por motivos de seguridad.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo se presentan de forma resumida a continuación.

Los diferentes experimentos realizados en discontinuo con diferentes tipos de radiación han puesto de manifiesto que las células crecen a la misma velocidad media, independientemente del tipo de radiación que absorban, siempre que reciban el mismo flujo de fotones. Este hecho confirma que la modelización y control del sistema debe basarse en unidades cuánticas en vez de unidades de energía.

En experimentos en continuo y a escala laboratorio en los que se ha ido variando la irradiancia incidente, se han realizado observaciones que son de especial interés para el buen funcionamiento del compartimento II, y en consecuencia, para el bucle MELiSSA. Las principales observaciones pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Se ha observado que las células de *R. rubrum* son muy sensibles a la concentración de fuente de carbono residual en el cultivo, especialmente cuando la fuente de carbono es ácido acético.

En todos los casos en que la concentración de ácido acético residual en el cultivo se ha empezado a acumular, probablemente porque la radiación incidente era insuficiente para consumir la totalidad de la fuente de carbono, las células de *R. rubrum* inician una serie de cambios morfológicos, difícilmente reversibles, que inactivan el crecimiento de las células. Las células presentan inclusiones intracelulares, se alargan sin llegar a dividirse, se vuelven inmóviles y forman agregados de células que se adhieren entre sí y también a las paredes del fotobiorreactor. Se interpreta que el cambio en la morfología celular es debido a la puesta en marcha del metabolismo de reserva de las células, que ante la situación de falta de energía y exceso de la fuente de carbono, las células acumulan en su interior polímeros de reserva, concretamente, poli- β -hidroxibutirato.

- Cuando la fuente de carbono es ácido propiónico, aunque también se ha observado que las células acumulan en su interior polímeros de reserva, en este caso poli- β -hidroxibutirato y poli- β -hidroxivalerato, el crecimiento celular no llega a detenerse del todo, haciendo que la situación no sea tan crítica como en el caso del ácido acético.
- En experimentos en continuo con diferentes fuentes de carbono se ha confirmado que a medida que aumenta la longitud de la cadena carbonatada de la molécula del ácido graso volátil, las células de *R. rubrum* necesitan un aporte de energía en forma de radiación mayor para crecer a la misma velocidad específica de crecimiento.

También se ha puesto de manifiesto que en todos los experimentos en continuo, aparentemente el balance de carbono no se cumple en mayor o menor medida. Analizando las posibles causas, se apunta como la hipótesis más probable el hecho de que pequeñas cantidades de oxígeno que pueden llegar hasta el cultivo, posibiliten que una cierta fracción de células del cultivo crezca en condiciones de microaerofilia y, por tanto, desviando una parte de la fuente de carbono a CO₂.

También se ha observado que para el cultivo de estas células a una escala más grande, el sistema de agitación del fotobiorreactor es un factor decisivo en el

rendimiento del sistema. Mientras que la agitación por gas presenta problemas en el crecimiento de las células, la agitación mecánica constituye una muy buena alternativa.

A parte de los resultados obtenidos en los experimentos en que se ha utilizado el ácido acético como fuente de carbono, tanto en continuo como en discontinuo, se ha podido concebir y construir un modelo matemático que en función de las condiciones de iluminación, de las condiciones de operación y de la cantidad de fuente de carbono, permite predecir con razonable precisión la producción de células del fotobiorreactor por unidad de tiempo. El modelo se ha demostrado útil y fiable en su aplicación a biorreactores con características distintas.

Finalmente, el modelo matemático conjuntamente con la experiencia acumulada a lo largo de todos los experimentos realizados, han permitido el dimensionado y diseño preliminar del fotobiorreactor que desempeñará el papel del Compartimento II dentro del bucle MELISSA completo a escala piloto y de acuerdo con las necesidades derivadas del escenario dibujado para su integración y demostración. La construcción del fotobiorreactor de acuerdo con el diseño propuesto en este trabajo se está realizando actualmente.

6. ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

6.1. Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AGV	Ácidos grasos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CES	Sistema ecológico cerrado (<i>Closed Ecologic System</i>)
DTR	Distribución del tiempo de residencia
ESA	<i>European Space Agency</i>
ESM	Unidad de masa equivalente (útil para comparar los sistemas de soporte de vida entre sí).
ESTEC	European Space Research & Technology Centre
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
MCS	Ordenador de control del bucle MELISSA
LSS	Sistema de soporte de vida (<i>Life Support System</i>)
MC	Muestra liofilizada de células, almacenada a -80 °C, para su posterior análisis.

Abreviatura	Significado
MELISSA	<i>Micro Ecological Life Suport System Alternative</i>
MOS	Materia orgánica soluble
NASA	<i>National Aeronautics & Space Administration</i>
PAR	Radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)
PHA	Poli- β -hidroxialcanoatos
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PLC	Autómata programable
PPFD	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos (400-700 nm)

6.2. Nomenclatura

Símbolo	Descripción	Unidades
a	Coef. de atenuación de la luz en el interior del cultivo	
A	Sección del fotobiorreactor	m ²
C ₀	Concentración de C en la corriente de entrada al reactor	g C·L ⁻¹
C _B	Concentración de C en el tanque de entrada	g C·L ⁻¹
C _i	Concentración del ión <i>i</i> en la solución	g C·L ⁻¹
C _R	Concentración de C en el interior del reactor	g C·L ⁻¹
D	Velocidad de dilución	h ⁻¹
E	Einstein, equivalente a un mol de fotones	
H	Altura efectiva del fotobiorreactor	m
I	Fuerza iónica de la solución	
k	Coefficiente global de transferencia de materia	h ⁻¹
K _I	Constante de inhibición por carbono	g C·L ⁻¹
K _J	Constante de afinidad por la radiación utilizada	$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
k _{L,a}	Coef. global de transferencia de oxígeno de la fase gas a la líquida	h ⁻¹
K _S	Constante de afinidad por el sustrato	g C·L ⁻¹

Capítulo 6 – Abreviaturas y nomenclatura

Símbolo	Descripción	Unidades
L_T	Profundidad de la botella (longitud camino óptico)	m
m	Número de puntos experimentales	
n	Número de lámparas	
p	Número de parámetros de optimización	
P_R	Presión parcial de propiónico en el gas del interior del reactor	atm
P_T	Presión total	atm
P_V	Presión de vapor del ácido propiónico	atm
Q	Energía radiante	J
Q_0	Caudal de líquido de entrada al reactor	$L \cdot h^{-1}$
Q_λ	Energía radiante espectral	$J \cdot nm^{-1}$
Q_L	Caudal de líquido que entra y sale del reactor	$L \cdot h^{-1}$
R	Constante de los gases ideales	$atm \cdot L \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$
r	Distancia radial desde el centro del reactor a un punto	m
r_0	Radio en el que se conoce la irradiancia local disponible ψ_0 (radio del sensor de luz)	m
R_0	Radio del fotobiorreactor	m
$R_{k/n}$	Distancia desde la lámpara k hasta el centro del reactor	m
r_T	Recorrido de la luz dentro del cultivo	m
S	Concentración de sustrato en el cultivo	$g \cdot C \cdot L^{-1}$
S_{ent}	Concentración de sustrato en el medio de entrada	$g \cdot C \cdot L^{-1}$
t	Tiempo	h
V	Volumen de cultivo	L
V_G	Volumen de la fase gas	L
V_L	Volumen de líquido en el interior del tanque de medio entrada	L
V_R	Volumen de líquido en el interior del reactor	L
X	Concentración de células en el reactor	$g \text{ peso seco} \cdot L^{-1}$
x_B	Fracción molar de ácido propiónico en el líquido del tanque de entrada	
x_C	Fracción másica de C en las células	$g \cdot C \cdot g \text{ peso seco}^{-1}$
$Y_{X/S}$	Rendimiento células-sustrato	$g \text{ células} \cdot g \cdot C^{-1}$
z_i	Carga electrostática del ión i	

Símbolos griegos

Símbolo	Descripción	Unidades
α	Nivel de confianza	
ε	Coef. de absorción de la radiación de la Ley de <i>Lambert-Beer</i>	
Φ	Flujo radiante o potencia radiante	W
Φ_{λ}	Flujo radiante espectral	$W \cdot nm^{-1}$
γ	Coef. de actividad ácido propiónico en la solución	
μ	Velocidad específica de crecimiento de las células	h^{-1}
μ_m	Velocidad máxima específica de crecimiento	h^{-1}
$\bar{\mu}$	velocidad específica media de crecimiento	h^{-1}
τ	Tiempo de residencia	h
ξ	Radiancia	$W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1}$
ξ_{λ}	Radiancia espectral	$W \cdot m^{-2} \cdot sr^{-1} \cdot nm^{-1}$
ψ	Densidad de flujo radiante o irradiancia	$W \cdot m^{-2}$, $E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
ψ_0	Irradiancia incidente en un punto situado a r_0 del centro (irradiancia incidente que recibe el sensor de luz).	$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
$\bar{\psi}$	Irradiancia media en el cultivo	$\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
ζ	Intensidad radiante	$W \cdot sr^{-1}$
ζ_{λ}	Intensidad radiante espectral	$W \cdot sr^{-1} \cdot nm^{-1}$
ϕ_{IL}	Fracción de volumen iluminado respecto al volumen total	
θ	Ángulo entre la dirección del rayo de luz y eje abscisas (OX)	rad

7. REFERENCIAS

Acién Fernández, F.G.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Fernández Sevilla, J.M. y Molina Grima, E. 1998. Modelling of biomasa productivity in tubular photobiorreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.* **58**:605-616.

Acién Fernández, F.G.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Fernández Sevilla, J.M. y Molina Grima, E. 1997. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobiorreactor for the microalgal mass culture. *Biotech. Bioeng.*, **55**:701-714.

Aiba, S. 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. *Adv. Biochem. Eng.* **23**:85-156.

Albiol, J. 1994. Study of the MELISSA photoheterotrophic compartment. Kinetics and effects of C limitation. *ESA/YCL/2148.JAS ESTEC. Working paper. ESA-EWP-1808.*

Anderson, A.J. y Dawes, E.A. 1990. Ocurrente, metabolism. metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, **54**: 450-472.

Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. y Preiss, J. 2003. ADP-Glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, **67**: 213-225.

Banat, F.; Al-Asheh, S. y Simandi, J. 2003. Vapor-liquid equilibria of propionic acid-water system in the presence of different types of inorganic salts: effect of temperatura and salt concentration. *Chemical Engineering and Processing*, **42**: 917-923.

Brandl, H.; Knee, E.J. Jr.; Fuller, R.C.; Gross, R.A. y Lenz, R.W. 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.*, **11**: 49-55.

Brock, T.D. y Madigan, M.T. 1993. Microbiología. Ed. Prentice Hall. Sexta edición. Mexico.

Brune, D.C. 1995. Sulfur compounds as photosyntetic electron donors. En: Anoxygenic photosyntetic bacteria. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Kluwer, Holanda, 847-870.

Buchanan, B.B.; Evans, M.C.W. y Arnol, D.I. 1967. Ferredoxin dependent carbon assimilation in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.*, **59**: 32-59.

Byron, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. En: *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Mobley D.P. Hanser, Alemania. 24-30.

Camacho, R.F.; Padial, V.A. y Martínez, M^a. E. 1982. Intensidad media de iluminación en cultivos de *Chlorella pyrenoidosa*. *An. Quim.*, **78**:371-375.

Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola. Ed. Universidad Nacional de Salta. Argentina. Cap. 3, 1-28.

Cerezo, E. y Serón, F.J. 2003. An approach to the simulation of the sea as participating medium. *Computer & Graphics*, **27(4)**:487-501.

Cloutier, G.; Dixon, M.A.; Hunter, J.B.; Olabi, A. y Lasseur, Ch. 2000. Crop production area requirements based on optimized menus for Advanced Life Support. *Life Support & Biosphere Science*, **7(1)**:76.

Cornet, J. F.; Dussap, C. G.; Cluzel, P. y Dubertret, G. 1992. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobiorreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotech. Bioeng.* **40**:826-834.

Cornet, J.F. y Albiol, J. 2000. Modeling photoheterotrophic growth kinetics of *Rhodospirillum rubrum* in rectangular photobiorreactors. *Biotechnol. Prog.* **16(2)**:199-207.

Cornet, J.F.; Dussap, C.G y Gros, J.B. 1995. A simplified monodimensional approach of modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobiorreactors. *Chem Eng Process*, **38**:517-523.

Cornet, J.F.; Dussap, C.G. y Dubertret, G. 1992. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobiorreactors: I. Coupling between light transfer and growth kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:817-828.

Cornet, J.F.; Dussap, C.G. y Gros, J.B. 1994. Conversion of radiant light energy in photobiorreactors. *AIChE J.* **40**:1055-1066.

Cornet, J.F.; Favier-Teodorescu, L. y Dussap, C.G. 2003. Modeling stability of photoheterotrophic continuous cultures in photobiorreactors. *Biotech. Prog.* **19**(4):1216-1227.

Creus, N. 2003. Estudi d'un bucle de biorreactors pel desenvolupament d'un sistema de suport de vida biològic. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalunya.

Dawes, E.A. 1986. Microbial energy reserve compounds. En: *Microbial energetics*. Chapman & Hall, New York, USA. 145-165.

Demey, D. y van Meenen, P. 1997. Anaerobic thermophilic biodegradation of faecal materia. *Sixth European Symposium on Space Environmental Control Systems*. Noordwijk, Holanda.

Demey, D. y van Meenen, P. 1998. The liquefying compartment. En: MELISSA Final Report for 1997 Activity Memorandum of Understanding. ECT/FG/MMM/97.012. Lasseur, Ch. (editor). Noordwijk, Holanda.

Draper, N.R. y Smith, H. 1998. *Applied Regresión Analysis*. Ed. Wiley-Interscience (3ª edición). USA.

Drysdale, A.E.; Dooley, H.A.; Knott, W.M.; Sager, J.C.; Stutte, G.W y Malckowiak, C.L. 1994. A more completely defined CELSS. 24th International Conference on Environmental Systems. Friedrichshafen, Alemania. SAE Technical Paper 941456.

Drysdale, A.E.; Levri, J.A. y Vaccari, D.A. 2000. Theory and Application of the Equivalent System Mass Metric. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse. SAE Technical Paper 2000-01-2395.

Duboc, P.; Schill, N.; Menoud, L.; van Gulik, W. y von Stockar, U. 1995. Measurements of sulfur, phosphorous and other ions in microbial biomass: influence on correct determination of elemental composition and degree of reduction. *J. Biotechnol.*, **43**(2):145-158.

Eckart, P. 1994. Life Support and Biospheric. Herbert Utz Publisher. München, Alemania.

Eckart, P. 1999. System considerations for long duration life support - The Lunar Base exemple. Presentación oral. Workshop on Advanced Life Support. Noordwijk, Holanda.

Eidels, L. y Preiss, J. 1970. Carbohydrate metabolism in *Rhodopseudomonas capsulata*. Enzyme titers, glucose metabolism, and poluglucose polymer synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**:75.

Favier-Teodorescu, L.; Cornet, J.F. y Dussap, C.G. 2003. Modeling continuous culture of *Rhodospirillum rubrum* in rectangular in photobiorreactor under light limited conditions. *Biotechnol. Lett.* **14**:359-364.

Filatova, L.; Berg, I.; Krasil'nikova, E; y Ivanovsky, R. 2005. A study of the mechanism of acetate assimilation in purple nonsulfur bacteria lacking the glyoxylate shunt: enzymes of thcitramalate cycle in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, **74**:270-278.

Forler, C. 1992. MELISSA: première étude du compartiment nitrificateur. CUST. Clermond Ferrand, ESA/YCL 1567/CF. Noordwijk, Holanda.

Forler, C. 1994. Development of a fixed bed pilot reactor for a continuous axenic coculture of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi*. ESA-X-997.

Fotiadis, D.; Qian, P.; Philippsen, A.; Bullough, P.A.; Engel, A y Neil-Hunter, C. 2004. Structural analysis of the RC-LH1 photosynthetic core complex of *Rhodospirillum rubrum* using atomic force microscopy. *J. Biol. Chem.* **279**(3):2063-2068.

Gicqueau, B. 1993. MELISSA: culture continue de *Rhodobacter capsulatus*. Etude de sources carbonées et influence de la lumière. UTC Compiègne. *Produits biologiques et alimentaires*. ESA-953, YCL 1775.BG.

Gitelson, I.I.; Kovrov, B.G.; Lisovsky, G.M.; Okladnikov, Y.N.; Rerberg, M.S.; Sid'ko, F.Y. y Terskov, I.A. 1975. Problemy Kosmicheskoy Niologii: experimental'nyye ekologicheskije sistemy vklyuchayushchiye cheloveka. *Nauka Press Moscow*. **28**:1-312. NASA Technical Translation NASA-TT-F-16993.

Gitelson, I.I.; Terskov, I.A.; Kovrov, B.G.; Lisovsky, G.M.; Okladnikov, Y.N.; Sid'ko, F.Y.; Trubachev, I.A.; Shillenko, M.P.; Alekseev, S.S.; Pankova, I.M. y Tirranen, L.S. 1989. Long term experiments on man's stay in biological life-support system. *Adv. Space Res.* **9**:865-871..

Göbel, F. 1969. Measurements of the radiation balance in suspensions of photosynthetic bacteria. En: Progress in photosynthesis research. H. Metzner Ed. Vol. III, 1122-1127.

Göbel, F. 1978a. Direct measurements of pure absorbance spectra of living phototrophic microorganisms. *Biochim. Biophys*, **538**:593-602.

Göbel, F. 1978b. Quantum efficiencies of growth. En: The photosynthetic bacteria. Ed. Clayton and Sistrom. *Plenum Press*. New York. 907-925.

Goedheer, J. C. 1959. Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria. *Biochem. Biophys*, **35**:1-8.

Grammel, H.; Gilles, E.D. y Ghosh, R. 2003. Microaerophilic cooperation of reductive and oxidative pathways allows maximal photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(11):6577-6586.

Gross, R.A.; Brandl, H.; Ulmer, H.W.; Posada, M.A. y Fuller, R.C. 1989. The biosynthesis and characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Polym. Prepr.*, **30**:492-493.

Gustavino, S.R.; Fadden, C.D. y Davenport, R.J. 1994. Concepts for advanced waste water processing systems. 24th International conference on Environmental Systems. Friedrichshafen. SAE Technical Paper 941500.

Guterman, H.; Vonshak y A.; Ben-Yaakov, S. 1990. A macromodel for outdoor algal mass production. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**:809-819.

Halbleib, C.M. y Ludden, P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.*, **130**:1081-1084.

Hanaki, K.; Wantamin, C. y Ohgaki, S. 1990. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water Res.*, **24**:289-296.

Handrick, R.; Reinhardt, S.; Kimming, P. y Jendrossek, D. 2004. The "Intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHN and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *Journal of bacteriology*, **186**(24):7243-7253.

Hanegraaf, P.P.F. y Muller E.B. 2001. The dynamics of the macromolecular composition of biomass. *J. theor. Biol.*, **212**, 237-251.

Hansen, T.A. y Gernerden, H. 1972. Sulphide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, **86**:49-56.

Hecht, E. y Zajac, A. 1987. Optics. 2nd ed. Addison-Wesley. Reading, USA.

Hoekema, S.; Douma, R.D.; Janssen, M.; Tramper, J. y Wijffels, R.H. 2006. Controlling light-use by *Rhodobacter capsulatus* continuous cultures in a flat-panel photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **95**(4):613-626.

Hu, X.; Damjanovic, A.; Ritz, T. y Schulten, K. 1998. Architecture and mechanism of the light-harvesting apparatus of purple bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:5935-5941.

Hunik, J.H.; Bos, C.G.; Den Hoogen, M.P.; De Gooijer, C.D. y Tramper, J. 1994. Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in K-carrageenan gel beads. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**:1153-1163.

Husted, E.; Steinbuchel, A. y Schlegel, H.G. 1993. Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**:87-93.

Imhoff, J.F. 1995. Taxonomy and physiology of phototrophic purple bacteria and green sulfur bacteria. En: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship, R.E.; Madigan, M.T.; Bauer, C.E. Ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. 1-15.

Imhoff, J.F. y Truper, H.G. 1989. The purple nonsulfur bacteria. En: Bergey's manual of systematic bacteriology. Stanley, J.T.; Bryant, M.P.; Pfennig, N.; Holt, J.C. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. Vol. 3, 1658-1661.

Imhoff, J.F. y Truper, H.G. 1991. The genus *Rhodospirillum* and related genera. En: The prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.H. 2nd ed. Springer Verlag. New York, USA. 2140-2153.

Ingraham, J.L.; Maaloe, O. y Neidhardt, F.C. 1983. Growth of the bacterial cell. Sunderland Sinauer Associated.

Ivanovski, R.N.; Krasil'nikova, E.N. y Berg, I.A. 1997. A proposed citramalate cycle for acetate assimilation in the purple nonsulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*. FEMS Microb. Lett., **153**:399-404.

Iwakura, M.; Tokushige, M.; Katsuki, H. y Muramatsu, S. 1978. Studies on regulatory functions of malic enzymes. V. Comparative studies of malic enzymes in bacteria. *J. Biochem.*, **83**(5):1387-1394.

Jamieson, S.J.; Wang, P.; Qian, P.; Kirkland, J.Y.; Conroy, M.J.; Hunter, C.N. y Bullough, P.A. 2002. Projection structure of the photosynthetic reaction centre-antenna complex of *Rhodospirillum rubrum* at 8.5 Å resolution. *The EMBO Journal*, **21**(5):3927-3935.

Kaku, M. 1994. Hyperspace. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.

Karel, M. y Kamarei, A.R. 1984. Feasibility of producing a range of food products from a limited range of undifferentiated major food components. NASA contract report 177329. Ames Research Centre. California, USA.

Karel, M. y Nakhost, Z. 1989. Potential utilisation of algal protein concentrate as a food ingredient in space habitats. *Sci. Aliment*, **9**:491-506.

Katsuda, T.; Arimoto, T.; Igarashi, K.; Azuma, M. Kato, J. Takakuwa, S.; Ooshima, H. 2000. Light intensity distribution in the externally illuminated cylindrical photobioreactor and its application to hydrogen production by *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem. Eng. J.*, **5**:157-164.

Kibe, S.; Suzuki, K.; Ashida, A.; Otsubo, K. y Nitta, K. 1997. Controlled Ecological Life Support System-Related Activities in Japan. *Life Support & Biosphere Science*, **4**:117-125.

- Kobayashi, M. y Haque, M.Z.** 1971. Contribution to nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. *Plant and soil*, special vol., 443-456.
- Kobayashi, M. y Kurata, S.** 1978. Mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. *Process Biochem.* **13**:27-30.
- Kohen, E.; Santus, R. y Hirschberg, J.G.** 1995. Photobiology. *Academic Press*, 202-204.
- Kompatseva, E.I.** 1981. Utilization of sulfide by nonsulfur purple bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Microbiologiya.* **50**(3):429-436.
- Kopal Z.** 1991. Radiative energy transfer in extended photospheres of the components of close binary systems. *Astrophysics and Space Science.* **186**:253-276.
- Krauss, R.G.** 1979. Closed ecology in space from a bioengineering perspective. *Life Sci. Space Res.* **17**:13-25.
- Lange, H.C.; Heijnen J.J.** 2001. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* **5**:75(3):334-44
- Lasseur, C. y Binot, R.A.** 1991. Control system for artificial ecosystems – Application to MELISSA. 21st International Conference on Environmental System. Ref. 911468.
- Lasseur, C. y Fedele, I.** 2000. Final report for 1999 Activity Memorandum of Understanding ECT/FG/MMM/97.012. ESA/EWP-2092.
- Lee, H.Y.; Erickson, L.E. y Yang, S.S.** 1987. Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* **29**:832-843.

Lemos, P.C.; Viana, C.; Salgueiro, E.N.; Ramos, A.M.; Crespo, J.P.S.G. y Reis, M.A.M. 1998. Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme and Microbial Technology*. **22**(8):662-671.

Lemos, P.C.; Serafim, L.S.; Santos, M.M.; Reis, M.A.M. y Santos, H. 2003. Metabolic pathway for propionate utilization by phosphorus-accumulating organisms in activated sludge: ¹³C labeling and in vivo nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(1):241-251.

Litchfield, J.H. 1983. Single cells proteins. *Science*, **219**:740-746.

Ludden, P.W. y Roberts, G.P. 1995. The biochemistry and genetics of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria. En: Anoxygenic photosynthetic bacteria. Blankenship, R.E.; Madigan, M.T.; Bauer, C.E. (editores). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. 929-947.

Madigan, M.T. 1988. Microbiology, physiology, and ecology of phototrophic bacteria. En: Biology of anaerobic microorganisms. Alexander J.B. Zehnder (editores). John Wiley & Sons.

Madigan, M.T.; Cox, S.S. y Stegeman, R.A. 1984. Nitrogen fixation and nitrogenase activities in members of the family *Rhodospirillaceae*. *J. Bacteriol.*, **157**:73-78.

Madison, L.L. y Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, **63**(1):21-53.

Martínez, M.E.; Camacho, F.; Jiménez, J.M. y Espínola, J.B. 1997. Influence of light intensity on the kinetics and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochemistry*, **32**(2):93-98.

Masot, A.; Albiol, J.; Godia, F.; Waters, G.; Dixon, M. A. 2004. Static Mass Balance Studies of the MELISSA Pilot Plant: Integration of a Higher Plant Chamber. International Conference on Environmental Systems. Colorado Springs, USA. SAE Technical Paper 2004-01-2579.

McElroy, R.D. y Wang, D. 1989. Waste recycling issues in bioregenerative life support. *Adv. Space Res.* **9**:75-884.

Meister, M.; Saum, S.; Alber, B. y Fuchs, G. 2005. L-Malyl-Coenzyme A/ β -Methylmalyl-Coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, **187**(4):1415-1425.

Meleshko, G.I.; Sheoelev, Y.Y.; Averner, M. y Volk, T. 1991. Biological life support systems. En: Space Biology and Medicine. Nicogossian, A.E.; Mohler, S.R.; Gazenco, O.G. y Grigoryev, A.I. (editores). American Institute of Aeronautics Publishers. 357-394.

Mergeay, M.; Verstraete, W.; Dubertret, G.; Lefort-Tran, M.; Chipaux, C. y Binot, R. 1988. MELISSA. A Microorganisms based model for CELSS development. Proceedings of the 3rd symposium on space thermal control & life support system. Noordwijk, Holanda. 65-68.

Merrick, J.F. y Doudoroff, M. 1961. Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in bacteria. En: The photosynthetic bacteria. Clayton, R.K. y Sistrom, W.R. (editores). Plenum Press, New York, USA. 199-219.

Molima Grima E.; García Camacho, F.; Sánchez-Pérez, J.A.; Ación Fernández, F.G. y Fernández Sevilla, J.M. 1997. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**:375-381.

Neale, P.J. 1987. Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. En: Photoinhibition. Kyle, D.J.; Osmond, C.B.; Arntzen, C.J. (editores). Elsevier. New York, USA. 39-65.

Neidhardt, F.C.; Ingraham, J.L. y Schaechter, M. 1994. *Physiologie de la cellule bactérienne*. Masson. París, Francia.

Noorman, H. 1991. Methodology on monitoring and modelling of microbial metabolism. Tesis doctoral. Delft University of Technology. Holanda.

Ogawa, T.; Kozawa, H. y Terui, G. 1971. Studies on the growth of *Spirulina platensis* (II) growth kinetics of an autotrophic culture. *J. Ferment. Technol.* **50**:143-149.

Ojumu, T.V.; Yu, J. y Solomon, B.O. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology.* **3**(1):18-24.

Osburg, J. y Messerschmid, E. 2000. Integrated Simulation of Synergistic Space Station Subsystems During the Conceptual Design Phase. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse, Francia. SAE Technical Paper 2000-01-2398.

Pérez, J. 1997. Caracterización y puesta a punto de reactores de lecho fijo para su aplicación en procesos de nitrificación. Trabajo de Master. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalunya.

Pérez, J. 2001. Utilización de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en forma de biopelícula para la nitrificación biológica en reactores de lecho fijo. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalunya.

Pfenning, N. y Trupper, H.G. 1977. Higher taxa of the phototrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **21**:17-18.

Porter, J. y Merret, M.J. 1970. Formation of glyoxylate from α -hydroxyglutarate by *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett.*, **7**:271-273.

Preiss, J. 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**:419-458.

Preiss, J. y Greenberg, E. 1981. Biosynthesis of bacterial glycogen: activator specificity of the adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylases from the genus *Rhodospirillum*. *Journal of Bacteriology*, **147**(3):711-719.

Prokop, A. y Erickson, L.E. 1995. Photobiorreactors. En: Vioreactor system design. Asenjo, J.A., Merchuck, J.C. (editores). Marcel Dekker. New York, USA. 441-477.

Ratchford, I.A.J. y Fallowfield, H.J. 1992. Performance of a flat plate, air-lift reactor for the growth of high biomass algal cultures. *J. Appl. Phycol.*, **4**:1-9.

Rorrer, G.L. y Mullikin, R.K. 1999. Modeling and simulation of a tubular recycle photobiorreactor for macroalgal cell suspension cultures. *Chemical Engineering Science*, **54**(10):3153-3162.

Samsonov, N.M.; Kurmazenko, E.A.; Farafonov, N.S. y Menkin, E.V. 2000. An efficiency of technologies and a strategy for synthesis of integrated life support system efficiency. 30th International Conference on Environmental Systems. Toulouse. SAE Technical Paper 2000-01-2396.

Satoh, H.; Mino, T. y Matsuo, T. 1992. Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes. *Water Science & Technology*. **26**(1-12):933-942.

Sawada, H. y Rogers, P.L. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment – Pure culture studies with *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Ferm. Technol.*, **55**:297-310.

Scheuring, S.; Sturgis, J.N.; Prima, V.; Bernadac, A.; Lévy, D. y Rigaud, J.L. 2004. Watching the photosynthetic apparatus in native membranes. *Proceedings of the National Academy of Science*, **101**(31):11293-11297.

Schipman, R.H.; Fan, L.T. y Kao I.C. 1977. Single cell protein production by photosynthetic bacteria. En: *Advances in Applied Microbiology*. Perlman, D. (editor). Academic Press. Vol. 21. New York, USA. 161-183.

Senior, P.J. y Dawes, E.A. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**:55-66.

Shuster, A. 1905. Radiation through a foggy atmosphere. *Astrophys. J.*, **21**:1-22.

Sojka, G.A. 1978. Metabolism of nonaromatic compounds. En: *The photosynthetic bacteria*. Clayton, R.K. y Sistrom, W.R. (editores). Plenum Press. New York, USA. 708-718.

Stanier, R.Y.; Doudoroff, M.; Kunisawa, R. y Contopoulou, R. 1959. The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. *Biochemistry*, **45**:1246-1260.

Stark, H. y Lubensky, T.C. 1997. Multiple light scattering in anisotropic random media. *Physical Review E.*, **55**(1):514-533.

Stephanopoulos, G.N.; Aristidou, A.A. y Nielsen, J. 1998. *Metabolic engineering. Principles and methodologies*. Academic press. San Diego, USA.

Storro, I. y McFadden, B.A. 1981. Glycolate excretion by *Rhodospirillum rubrum*. *Arch. Microbiol.* **129**:317-320.

Suh, I.S. y Lee, S.B. 2001. Cultivation of cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, **13**:381-388.

Suh, I.S. y Lee, S.B. 2003. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **82**(2):180-189.

Suhaimi, M.; Liessens, J. y Verstraete W. 1987. NH_4^+ -N assimilation by *Rhodobacter capsulatus* ATCC 23782 grown axenically and non-axenically in N and C rich media. *J. App. Bacteriol.* **62**:53-63.

Sukenik, A.; Levy, R.S.; Levy, Y.; Falkowdki, P.G. y Dubinsky, Z. 1991. Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: A simulation model. *J. Appl. Phycol.* **3**:191-201.

Tamponet, C. y Savage, C. 1994. Closed ecological systems. *J. Biol. Educ.*, **28**:167-173.

Thornber, J.P., Cogdell, R.J.; Pierson, B.K. y Sefror, R.E.B. 1983. Pigment-protein complexes of purple photosynthetic bacteria: an overview. *J. Cell. Biochem.*, **23**:159-169.

Tranquile, N.; Emeis, J.J.; De Chambure, D.; Binot, R.A. y Tamponnet, C. 1994. *Spirulina* acceptability trial in rats. A study for the MELISSA life support system. *Adv. Space Res.* **14**:167-170.

Vernerey, A. 2000. Conception, controle et fonctionnement d'un photobioreacteur pour la culture en mode continu de la cyanobacterie *Spirulina platensis*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona (Catalunya) y Université de Technologie de Compiègne (Francia).

Viprey, E. 1994. MELISSA: *Rhodospirillum rubrum*. Etude de la limitation azotée. UTC Compiègne, Produits biologiques et alimentaires. ESA-X-1102.

Vodovotz, Y. 1998. Advanced life support systems at Johnson Space Center. Proceedings of International Committee for Material Circulation in Geo-hydrosphere and its Applications. Cultural Exchange Plaza, Rokkasko, Aomori. Japón.

Von Puttkamer, J. 1987. Der Mensch im Weltraum. Uine Notwendigkeit Umschau. Verlag, Frankfurt. Alemania.

Vrati, S. 1984. Single cell protein production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluent of biogas plant. *Appl. Microbiol. Biot.*, **19**:199-202.

Vrati, S. y Verma, J. 1983. Production of molecular hydrogen and single cell protein by *Rhodospseudomonas capsulata* from cow dung. *J. Fermentation Technol.*, **61**:157-162.

Wheeler, R. 1992. Crop tests in NASA's Biomass production chamber – A review of the last four years of operation. Proceedings of the International Conference on Life Supports and Biospherics. 563-573.

Willison, J.C. 1988. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *R. capsulatus*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**:2429:2439.

8. ANEXOS

8.1. Diagrama de ingeniería (PID) del Compartimento II
