



Trabajo Fin de Grado

Estudio de la cinética fermentativa de
Saccharomyces cerevisiae, en presencia de
lindano, en un proceso de fermentación
discontinuo (batch)

Autor

Eduardo Sánchez Torres

Directores

Antonio Monzón Bescós
José Ignacio Villacampa Elfau

Escuela Politécnica Superior de Huesca

2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a mis directores, José Ignacio Villacampa Elfau y Antonio Monzón Bescós por toda su dedicación, esfuerzo y ganas para que este proyecto saliera adelante y por lo que me han enseñado. Deseo agradecer también la confianza depositada en mí que me ha motivado durante todo este tiempo.

A José Antonio Manso Alonso que me ha guiado a lo largo de todo el trabajo de laboratorio transmitiéndome su gran experiencia y a José María Garcés Tebar que siempre me ha ayudado con amabilidad en todo lo que le he pedido.

A mis compañeras favoritas que han hecho que mi paso por Huesca merezca la pena por haberlas conocido.

A ti, coleccionista de sensaciones, por los buenos momentos vividos.

A mi familia: mi padre, mi madre y mi hermana que son todo lo que tengo y les quiero mucho.

Y por último a Bea, que me animó a elegir un rumbo del cual hoy estoy muy orgulloso.

Gracias a todos.

RESUMEN

El bioprocесado es una parte esencial de muchas industrias de alimentación, químicas y farmacéuticas. Los bioprocесos utilizan células microbianas, animales o vegetales y componentes de esas células, como por ejemplo enzimas, para producir nuevos productos y destruir residuos nocivos. Las técnicas biotecnológicas actuales ofrecen nuevas oportunidades para el desarrollo y mejora del bioprocесado. El presente trabajo se centra en la puesta en marcha de una línea de experimentación de bioprocесos a través de la utilización de un biorreactor discontinuo a escala de laboratorio perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente que nunca ha sido utilizado con fines de investigación. Para ello se ha estudiado la cinética fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de lindano (γ -HCH), midiendo el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato (glucosa) y la formación de producto (etanol) y realizando un ajuste experimental a distintos modelos cinéticos empíricos para la modelización del proceso bajo distintas temperaturas. Se ha conseguido una reproducibilidad en los experimentos muy significativa a través de los protocolos elaborados y de las condiciones de trabajo empleadas, siendo el modelo cinético que mejor ajusta los datos experimentales el denominado Tessier-Aiba, con el cual se han obtenido las energías de activación aparentes de proceso. La cinética fermentativa no se ve alterada bajo concentraciones por debajo de 2000 ppb de lindano en el medio de cultivo y no existen evidencias claras de su metabolización para su uso como fuente de carbono y energía.

Palabras clave: bioprocесо, biorreactor, *Saccharomyces cerevisiae*, lindano.

ABSTRACT

Bioprocessing is an essential part of many food, chemical and pharmaceutical industries. Bioprocess operations make use of microbial, animal and plant cells and components of cells such as enzymes to manufacture new products and destroy harmful wastes. Current biotechnological techniques offer new opportunities for the development and improvement of bioprocessing. This study is based on the use of a discontinuous laboratory bioreactor has never been used in this area. We have studied the kinetics fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of lindane (γ -HCH) by measuring microbial growth, substrate consumption (glucose) and product formation (ethanol) and fitting with kinetics models for different temperatures. Reproducibility was very significant in the experiments. The kinetic model that best fits the experimental data is called Tessier -Aiba, with which have been obtained apparent activation energies of the process. Fermentation kinetics is constant with lindane concentrations below 2000 ppb in the culture medium and it isn't used as a source of carbon and energy.

Key words: bioprocess, bioreactor, *Saccharomyces cerevisiae*, lindane.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	El lindano y su biorremediación	1
1.2	La levadura: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2	JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES	5
2.1	Justificación.....	5
2.2	Antecedentes	5
3	OBJETIVOS	6
4	MATERIAL Y MÉTODOS	7
4.1	Microorganismo y sustrato	7
4.1.1	Cepa.....	7
4.1.2	Medio de cultivo	8
4.2	Equipos	9
4.2.1	Biorreactor.....	9
4.2.2	Equipos auxiliares	11
4.3	Protocolo de fermentación.....	14
4.3.1	Preparación del preinóculo e inoculación	14
4.3.2	Disoluciones correctoras del pH	15
4.3.3	Preparación del biorreactor.....	15
4.3.4	Sistema de monitorización y control	16
4.3.5	Toma de muestras	17
4.4	Medidas biológicas	17
4.4.1	Determinación del crecimiento microbiano	17
4.4.2	Ánálisis del sustrato: Glucosa.....	22
4.4.3	Ánálisis del producto: Etanol.....	23
4.5	Fermentación con lindano.....	27
4.5.1	Dopaje del biorreactor.....	27
4.5.2	Ánálisis del lindano	28
4.6	Crecimiento microbiano	30
4.6.1	Fermentación discontinua.....	30
4.6.2	Velocidades específicas y rendimientos	31
4.6.3	Modelos cinéticos de crecimiento microbiano	38
4.6.4	Fermentación alcohólica y balance de materia	39
4.6.5	Efecto de la temperatura en la cinética celular	41
4.7	Cálculo de los parámetros cinéticos.....	42
4.7.1	Ajuste y discriminación de modelos	42
4.7.2	Cálculo del efecto de la temperatura de reacción	43

4.8 Diseño de experimentos	44
4.8.1 Experimentos preliminares	44
4.8.2 Experimentos definitivos	45
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1 Comparativa experimental global.....	47
5.1.1 Fermentación en ausencia de lindano	47
5.1.2 Fermentación en presencia de lindano.....	51
5.2 Comparación de los modelos cinéticos	55
6 CONCLUSIONES	65
ANEXOS.....	67
Anexo 1. Protocolo de preparación del preinóculo	67
Anexo 2. Protocolo de toma de muestras.....	69
Anexo 3. Protocolo de determinación del número total de microorganismos	70
Anexo 4. Protocolo de determinación del peso seco celular	74
Anexo 5. Protocolo de análisis de glucosa	76
Anexo 6. Protocolo de análisis de etanol.....	79
Anexo 7. Protocolo de análisis de lindano	81
BIBLIOGRAFÍA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Reproducción asexual de SC al microscopio (fuente: elaboración propia).....	2
Figura 1.2. Ciclo sexual de SC. 1 – Gemación, 2 – Fusión, 3 – Esporulación (fuente: Wikimedia Commons licencia Creative Commons).....	3
Figura 1.3. Proceso de esporulación de SC (Wikimedia Commons licencia Creative Commons).	3
Figura 4.1. Biorreactor BioFlo 110 con sus módulos de control (fuente: manual equipo).....	10
Figura 4.2. Esquema del BioFlo 110 (fuente: manual equipo modificado)	12
Figura 4.3. Gráfico de relación absorbancia y peso seco celular o biomasa seca (fuente: elaboración propia).....	21
Figura 4.4. Recta de calibrado glucosa método fenol-sulfúrico (fuente: elaboración propia).....	23
Figura 4.5. Ejemplo genérico de un cromatograma (fuente: elaboración propia).....	24
Figura 4.6. Ejemplo de recta de calibrado de etanol para un experimento dado (fuente: elaboración propia).....	27
Figura 4.7. Ejemplo de recta de calibrado de lindano en hexano para un experimento dado (fuente: elaboración propia)	29
Figura 4.8. Fases del crecimiento celular en reactor discontinuo (fuente: elaboración propia) .	31
Figura 5.1. Concentración del número total de células frente al tiempo a distintas temperaturas.	47
Figura 5.2. Concentración de biomasa seca frente al tiempo a distintas temperaturas.....	48
Figura 5.3. Concentración de glucosa frente al tiempo a distintas temperaturas.....	49
Figura 5.4. Concentración de etanol frente al tiempo a distintas temperaturas.	50
Figura 5.5. Comparación de la concentración del número total de células frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.	52
Figura 5.6. Comparación de la concentración de biomasa seca frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.	53
Figura 5.7. Comparación de la concentración de glucosa frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.	53
Figura 5.8. Comparación de la concentración de etanol frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.	54

Figura 5.9. Ajuste de la concentración de biomasa a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.	56
Figura 5.10. Ajuste de la concentración de sustrato a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.	56
Figura 5.11. Ajuste de la concentración de producto a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.	57
Figura 5.12. Ajuste de la velocidad volumétrica frente al tiempo a través del modelo de Tessier, a 30 °C.	57
Figura 5.13. Ajuste de la concentración de biomasa, sustrato, producto y balance de materia a través del modelo de Tessier con inhibición Aiba, a 30 °C.	58
Figura 5.14. Representación de Arrhenius para la velocidad específica máxima de crecimiento.	62
Figura 5.15. Representación de Arrhenius para la constante de sustrato.	63
Figura 5.16. Representación de Arrhenius para la constante de producto.	63
Figura 5.17. Representación de Arrhenius para el rendimiento de biomasa a partir de sustrato.	64
Figura 5.18. Representación de Arrhenius para el rendimiento de biomasa a partir de producto.	64
Figura A 1. Esquema cámara Bürker y dimensiones de cuadrícula de un cuadrado grande (fuente: elaboración propia a partir de catálogo comercial Celeromics)	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Condiciones cromatográficas empleadas en los experimentos sin lindano	25
Tabla 4.2. Condiciones cromatográficas empleadas en los experimentos con lindano	26
Tabla 4.3. Condiciones cromatográficas para el análisis de lindano en hexano.	29
Tabla 4.4. Condiciones de operación de fermentación en ausencia de lindano	45
Tabla 4.5. Condiciones de operación de fermentación en presencia de lindano	45
Tabla 5.1. Rendimientos de etanol a partir de glucosa a distintas temperaturas.	51
Tabla 5.2. Análisis del lindano antes y después de la fermentación.	54
Tabla 5.3. Parámetros cinéticos resultantes de los ajustes para 30 °C	59
Tabla 5.4. Parámetros cinéticos resultantes del ajuste monovariable a través del modelo de Tessier-Aiba para varias temperaturas.	60
Tabla 5.5. Energías de activación de cada parámetro cinético a través del ajuste monovariable y multivariable para Tessier-Aiba.	62
Tabla A 1. Concentración de los patrones y volúmenes para su preparación	76
Tabla A 2. Concentración de patrones y volúmenes para su preparación	79
Tabla A 3. Concentración de patrones y volúmenes para su preparación	82

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El lindano y su biorremediación

El γ -Hexaclorociclohexano (γ -HCH) o comúnmente llamado lindano es uno de los ocho isómeros del 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaclorociclohexano. Posee excelentes cualidades biocidas, así como un proceso de fabricación relativamente sencillo, lo que ha resultado en elevados niveles de producción y utilización agrícola, forestal e incluso doméstica. Su toxicidad lo convierte en una sustancia peligrosa para el ser humano en última instancia. Actualmente está prohibido en toda Europa.

Además, el proceso de fabricación de lindano ha generado una gran cantidad de residuos (mezclas heterogéneas de los diferentes isómeros de HCH) que durante décadas han sido vertidos sin ningún tipo de control en el medio. Actualmente, como bien sabemos en la Comunidad Autónoma de Aragón, existen numerosos medios contaminados por lindano (suelos, sedimentos, aguas continentales y oceánicas, aire, biota), lo que constituye un gran problema medio ambiental pendiente de resolver (Calvelo Pereira, 2008).

La degradación biológica del lindano o biorremediación se puede llevar a cabo mediante diversos microorganismos facultativos, estrictamente anaerobios y aerobios (Jagnow, Haider, & Ellwardt, 1977; Mertens, Boon, & Verstraete, 2006). En algunos casos se han empleado medios de cultivo enriquecidos con glucosa, extracto de levadura, o peptona (degradación por co-metabolismo) en microorganismos como: *Bacillus circulans* o *Bacillus brevis* (Boyle, Häggblom, & Young, 1999; Gupta, Kaushik, & Kaushik, 2000; Sahu, Patnaik, Sharmila, & Sethunathan, 1990). Pero también se han encontrado especies capaces de aprovechar el lindano como única fuente de carbono y energía: *Pseudomonas* sp. (Sahu et al., 1990); *Xanthomonas* sp. ICH12 (Manickam, Misra, & Mayilraj, 2007); *Streptomyces* sp. M7 (Benimeli, Fuentes, Abate, & Amoroso, 2008); *Sphingobium japonicum* UT26 (Nagata, Endo, Ito, Ohtsubo, & Tsuda, 2007).

Mediante la biorremediación del lindano se busca que este sea mineralizado por completo y que no se generen metabolitos que resulten tóxicos como su precursor.

Incluso, con el avance de las técnicas de biología molecular en algunos estudios ha sido posible determinar la serie de genes denominados *lin*, donde se encuentra la información para la degradación del lindano, como en el caso específico de la cepa *Sphingobium japonicum* UT26, para la cual se han identificado 17 genes *lin* para la mineralización de este contaminante (Nagata et al., 2007).

1.2 La levadura: *Saccharomyces cerevisiae*

Según el CSIC, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está considerada por la comunidad científica como un potente modelo biológico de organismos eucariotas. Es la levadura del pan, del vino y de la cerveza y se ha convertido en un organismo de estudio común en el laboratorio. Las técnicas biotecnológicas actuales permiten modificar su genoma prácticamente a voluntad. Se puede eliminar, duplicar, reemplazar o modificar cualquier gen de la levadura sin afectar sustancialmente el resto del genoma. Esta facilidad con la que se pueden tratar genes concretos en la levadura es una gran ventaja para la experimentación biotecnológica (CSIC, 2011). Por todos estos motivos se ha elegido como microorganismo para el desarrollo del presente trabajo.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo unicelular eucariota, de forma más o menos redondeada. Se multiplica rápidamente por gemación (una forma asimétrica de reproducción asexual). A partir de una célula se origina una protuberancia que va creciendo y acaba dando lugar a otra célula, más pequeña (al principio) que la célula inicial y diferenciada genéticamente de la célula original (ver Figura 1.1). En condiciones adecuadas, este tipo de reproducción dura unas dos horas y permite la colonización total del medio de cultivo en cuestión de horas o días. El rápido crecimiento ha sido clave para su uso como herramienta para la investigación y las aplicaciones biotecnológicas (CSIC, 2011).

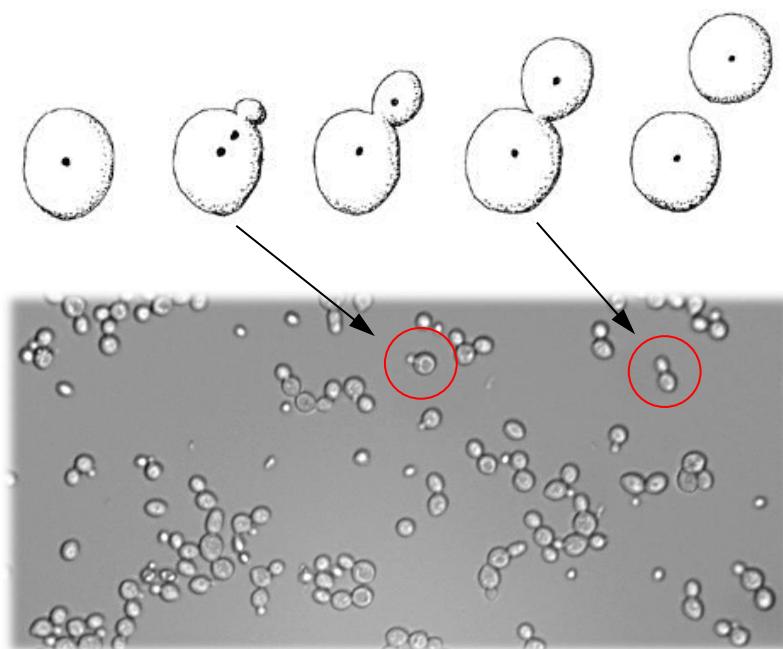


Figura 1.1. Reproducción asexual de SC al microscopio (fuente: elaboración propia).

La Figura 1.1 presenta una fotografía realizada en el desarrollo el bioproceso estudiado en el presente trabajo.

El ciclo sexual completo de la levadura (ver Figura 1.2) comienza con una célula diploide (32 cromosomas) que, en circunstancias de falta de nutrientes, esporula (ver Figura 1.3) generando cuatro esporas haploides (dos a y dos α). Cada espora por separado puede germinar y producir una colonia haploide (16 cromosomas), que se reproduce por gemación de forma indefinida. Si se encuentran una célula a con una α , actúan como gametos y se fusionan para dar lugar a un cigoto que, posteriormente, germina y origina una colonia diploide. Este ciclo presenta una complicación más, y es que las células a y α se pueden interconvertir la una con la otra (CSIC, 2011; Freeman, 2009).

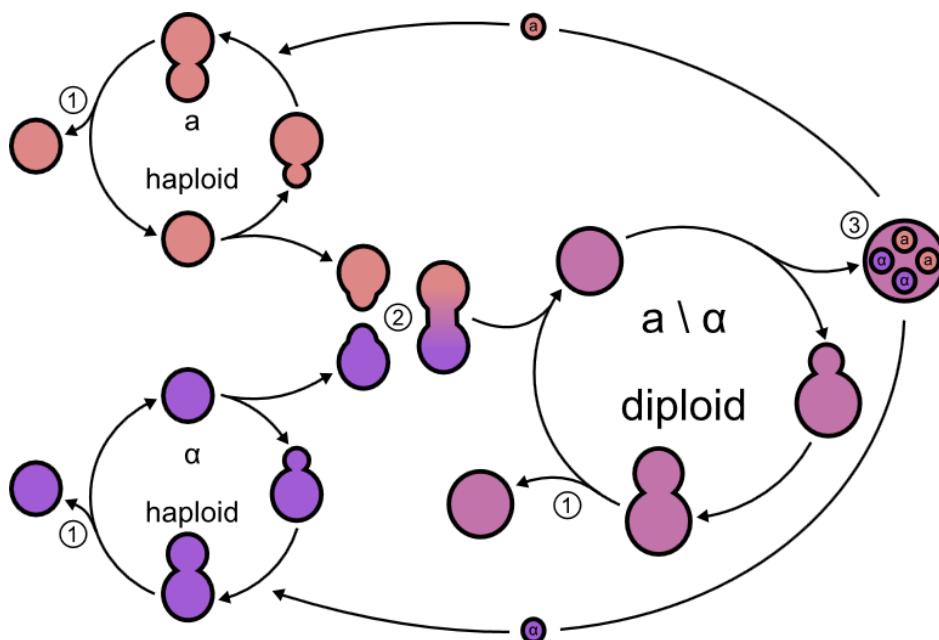


Figura 1.2. Ciclo sexual de SC. 1 – Gemación, 2 – Fusión, 3 – Esporulación (fuente: Wikimedia Commons licencia Creative Commons).

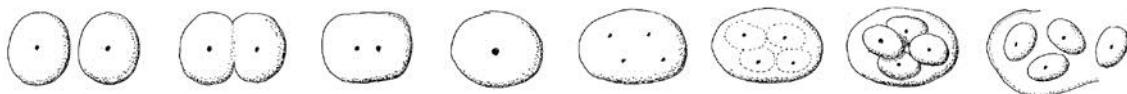


Figura 1.3. Proceso de esporulación de SC (Wikimedia Commons licencia Creative Commons).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de combinar un metabolismo fermentativo (anaerobio) con un metabolismo respirador (aerobio). En varias

aplicaciones biotecnológicas es imprescindible controlar esta alternancia entre metabolismo fermentativo y respirador. Si lo que se quiere producir es dióxido de carbono o etanol, debe favorecerse el metabolismo fermentativo. En cambio, si lo que se quiere es masa de levadura (biomasa) o cualquier producto celular (proteínas, polisacáridos y derivados o vitaminas), las condiciones más favorables se encuentran en el metabolismo respirador (Ward & Calvo Rebollar, 1991).

2 JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Justificación

La motivación inicial para la realización de este trabajo deriva de la idea de poner en marcha una línea de experimentación de bioprocessos basados en la utilización de un biorreactor a escala de laboratorio perteneciente al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, que se encuentra en la Escuela Politécnica Superior de Huesca y que nunca se ha utilizado con fines de investigación ni docencia en este ámbito.

Debido a que la contaminación por lindano en la Comunidad Autónoma de Aragón es un grave problema medioambiental no resuelto, se ha decidido iniciar una investigación sobre la interacción del lindano con *Saccharomyces cerevisiae* a nivel de su cinética fermentativa; un organismo modelo muy importante en la experimentación biotecnológica actual.

2.2 Antecedentes

Nunca se ha realizado ninguna investigación previa en la Universidad de Zaragoza en la que se haya utilizado el biorreactor comentado, para el desarrollo de algún bioprocreso, por lo cual no existen protocolos establecidos ni condiciones de trabajo fijadas con anterioridad para la realización de este trabajo fin de grado.

Por otro lado, no se han encontrado prácticamente estudios previos sobre la interacción del lindano con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y en ninguno de los revisados se estudia la cinética fermentativa a escala de biorreactor para la modelización del bioprocreso tal y como se pretende en este trabajo.

Según la investigación más reciente realizada a escala de matraz, las exposiciones de lindano en concentración de 14,5 ppm durante 72 horas de experimento inhibían el crecimiento de la levadura, con una disminución de la producción de biomasa y pérdida de la viabilidad celular ralentizando su metabolismo energético (Pita, Alves-Pereira, & Ferreira, 2014).

Incluso un estudio metabólico llevado a cabo por uno de los autores de la anterior investigación sugiere un posible uso del lindano como fuente de carbono en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* a nivel de matraz en ausencia de glucosa (Melicias Pita, 2014).

3 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar la influencia del lindano en los parámetros de la cinética fermentativa del metabolismo anaerobio en medio líquido de una cepa comercial seleccionada para vinificación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la consecución del objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la temperatura óptima de crecimiento de la levadura. Esta variable influye de forma importante sobre la velocidad metabólica, pues los microorganismos solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas (Doran, 1998).
2. Ajuste de los resultados obtenidos a distintos modelos cinéticos, indicando el que mejor describa el comportamiento experimental, determinando parámetros cinéticos: velocidades específicas y rendimientos.
3. Ensayo con lindano en esas condiciones óptimas determinadas para observar su efecto sobre la cinética fermentativa.

El objetivo paralelo que se persigue es la puesta en marcha de un biorreactor a escala de laboratorio que nunca se ha utilizado con fines de investigación ni docencia en el ámbito de la ingeniería de bioprocessos y que pertenece al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza. Para ello se elaboraron los protocolos necesarios para el correcto seguimiento del bioprocreso, así como las condiciones adecuadas de trabajo con vistas a una reproducibilidad experimental significativa.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Microorganismo y sustrato

4.1.1 Cepa

El microorganismo utilizado en este trabajo es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada para vinificación por la empresa Lallemand Inc. bajo el nombre comercial de Lalvin Clos (YSEO).

En concreto, fue aislada en la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona, por el Departamento de Bioquímica y Biotecnología en la zona del Priorato de la provincia de Tarragona, según las especificaciones aportadas por Lallemand Inc.

Sus características microbiológicas y enológicas (Torija, Rozès, Poblet, Guillamón, & Mas, 2001; Torija, 2002) relevantes para la realización de este trabajo son:

- *Saccharomyces cerevisiae* var. *Cerevisiae*.
- Alta tolerancia al etanol (hasta un 17 %).
- Corta fase de latencia.
- Velocidad de fermentación regular.
- Amplio rango de temperaturas de fermentación (de 13 a 32 °C).
- Bajas necesidades de nitrógeno asimilable.
- Baja producción de espuma.

Se presenta en forma de levadura seca activa (LSA) envasada al vacío en paquetes de 500 g. Durante la realización de este proyecto, una vez abierto el paquete, se ha conservado en su envase original y en refrigeración a 4 °C.

La levadura seca activa (LSA) se fabrica a partir de la deshidratación de una pasta de levadura, obtenida por fermentaciones de melazas dirigidas a la producción de biomasa. La biomasa obtenida tras la fermentación es lavada y concentrada mediante centrifugación hasta obtener una crema de levadura libre de melaza. La crema es filtrada, generalmente en filtros prensa, para adquirir la consistencia de una pasta, que posteriormente se extruye en finos filamentos para facilitar el secado. La deshidratación de la pasta de levadura extruida se realiza normalmente en secaderos de lecho fluidizado hasta una humedad residual del 8 % y a bajas temperaturas (35 - 40 °C) durante 15-60 minutos dependiendo de la cantidad de materia a procesar y de las condiciones empleadas (Garre García, 2008).

4.1.2 Medio de cultivo

Los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, minerales, a veces factores de crecimiento, agua y oxígeno (sin son aerobios) para formar su biomasa y como fuente de energía para la biosíntesis y mantenimiento celular (Ward & Calvo Rebollar, 1991).

El medio de cultivo líquido utilizado en este trabajo se ha preparado a partir de un medio deshidratado de glucosa y peptonas específico para el cultivo de levaduras fabricado por la empresa Panreac Química SLU bajo la denominación comercial: Glucosa Sabouraud, Caldo (Ph. Eur.) (Medio deshidratado) para microbiología (código. 413804).

Los componentes que forman el medio deshidratado son exactamente:

- D(+)-glucosa.
- Digerido péptico de tejido animal.
- Digerido pancreático de caseína.

Según las instrucciones de preparación que recomienda la casa comercial, al disolver 30 g de medio deshidratado en 1 L de agua destilada la composición que se tendrá es de 20 g/L de D(+)-glucosa, 5 g/L de digerido péptico de tejido animal y 5 g/L de digerido pancreático de caseína.

Para el correcto seguimiento de los experimentos (ver apartado 4.8) se ha trabajado en todos los ensayos y preinóculos realizados a la mitad de concentración, es decir la concentración del medio de cultivo ha sido de 15 g/L aportando entonces:

- 10 g/L de D(+)-glucosa.
- 2,5 g/L de digerido péptico de tejido animal.
- 2,5 g/L de digerido pancreático de caseína.

Tal y como indica la casa comercial, se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, procedimiento que se detalla en el apartado 4.3.

Se eligió la glucosa para este estudio ya que *Saccharomyces cerevisiae* la metaboliza preferencialmente a otros azúcares. Además, la cepa utilizada es de vinificación y está enfocada a fermentar mosto, que contiene como azúcares mayoritarios glucosa y fructosa (Ward & Calvo Rebollar, 1991).

4.2 Equipos

4.2.1 Biorreactor

El reactor utilizado para este trabajo es un biorreactor a escala de laboratorio autoclavable modelo BioFlo 110 fabricado por la empresa Eppendorf Inc. (antes New Brunswick Co Científica., Inc.) de 7,5 litros que se muestra en la Figura 4.1.

Se trata de un reactor de tipo tanque agitado (con sus módulos de control) que consta de los siguientes elementos principales:

- Recipiente de vidrio con camisa de agua.
- Calentador de la camisa de agua.
- Eje con dos turbinas de disco tipo Rushton y motor.
- Cuatro deflectores.
- Sondas de temperatura, pH, oxígeno disuelto y espuma.
- Cuatro bombas peristálticas para la adición de líquidos (ácidos y bases para el control del pH, anti-espumantes etc.).
- Salida de toma de muestras directa.
- Condensador.
- Entradas de adición de aire y líquidos.
- Sistema de monitorización y control.

El diseño del biorreactor tiene que ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos (De Martín Barry, 2005). Para ello debe:

- a) Distribuir las células uniformemente en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- b) Mantener constante y uniforme la temperatura.
- c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- d) Suministrar oxígeno a un ritmo tal que satisfaga el consumo en cultivos aeróbicos.
- e) El sistema debe ser tal que mantenga el cultivo puro, es decir libre de contaminación externa, una vez que el equipo ha sido esterilizado y posteriormente inoculado.
- f) Posibilidad de mantener constante el pH.
- g) Posibilidad de evitar pérdidas por evaporación.

Para satisfacer los cuatro primeros puntos se necesita que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, y además para el punto d) en cultivos aeróbicos se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo.

La agitación del biorreactor utilizado se realiza mediante un eje provisto de dos turbinas tipo Rushton accionado por un motor. La velocidad de agitación (rpm) se puede ajustar mediante el sistema de control al que está conectado el biorreactor. El aire que se introduce al mismo debe ser estéril. Se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios equidistantes. El chorro de aire que sale de cada orificio es “difuminado” por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el oxígeno hacia el líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro deflectores que tienen por finalidad romper el movimiento circular que provocan las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado (De Martín Barry, 2005; Ratledge, Kristiansen, & Liras Padín, 2009).

Para la medida del oxígeno se utiliza una sonda de oxígeno disuelto (OD) de la marca Mettler Toledo modelo InPro 6000.

En nuestro caso, como estudiamos la cinética fermentativa en el metabolismo anaerobio no hemos necesitado la inyección de aire en el cultivo.



Figura 4.1. Biorreactor BioFlo 110 con sus módulos de control (fuente: manual equipo).

Para cumplir el punto b) el biorreactor dispone de un sistema de control de la temperatura que está formado por un circuito de agua corriente que atraviesa la

camisa junto con un calentador para dicha camisa de agua. El flujo de agua corriente que entra a la camisa está regulado por una electroválvula. Una sonda de temperatura Pt-100 mide la temperatura en continuo.

Para mantener constante el pH, punto f), dos botellas de 500 mL rellenas con un ácido y una base están conectadas a dos bombas peristálticas que introducen pequeñas cantidades del ácido o de la base según se quiera disminuir o aumentar el pH del medio respectivamente. Para su medición en continuo se utiliza una sonda de pH de la marca Mettler Toledo modelo 405-DPAS-SC-K8S.

La sonda de espuma detecta la formación de espuma y activa la bomba peristáltica que añade pequeñas dosis de anti-espumante.

Por último, punto g), para evitar o minimizar las pérdidas por evaporación (Obom, Magno, & Cummings, 2013) se dispone de un condensador que es enfriado a través del paso de agua corriente.

En la Figura 4.2 se puede observar el esquema del modelo de biorreactor empleado así como la especificación de algunos de los elementos comentados.

4.2.2 Equipos auxiliares

Los equipos auxiliares necesarios para el desarrollo íntegro del proceso de fermentación se describen a continuación y se han utilizado para:

Autoclave

La esterilización del biorreactor así como de todo el material que va a estar en contacto con el microorganismo.

Cámara de cultivo

La preparación del preinóculo que requería el control de la temperatura durante su cultivo. Fabricante P Selecta modelo Medilow-S. A su vez, en el interior de la cámara se colocó un agitador magnético para mantener el cultivo agitado.

Congelador y nevera

La conservación de las muestras y de las levaduras secas activas (LSA) respectivamente.

Centrifuga para tubos Eppendorf

Centrifugar muestras en tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Fabricante LLG Labware modelo uniCFUGE5.

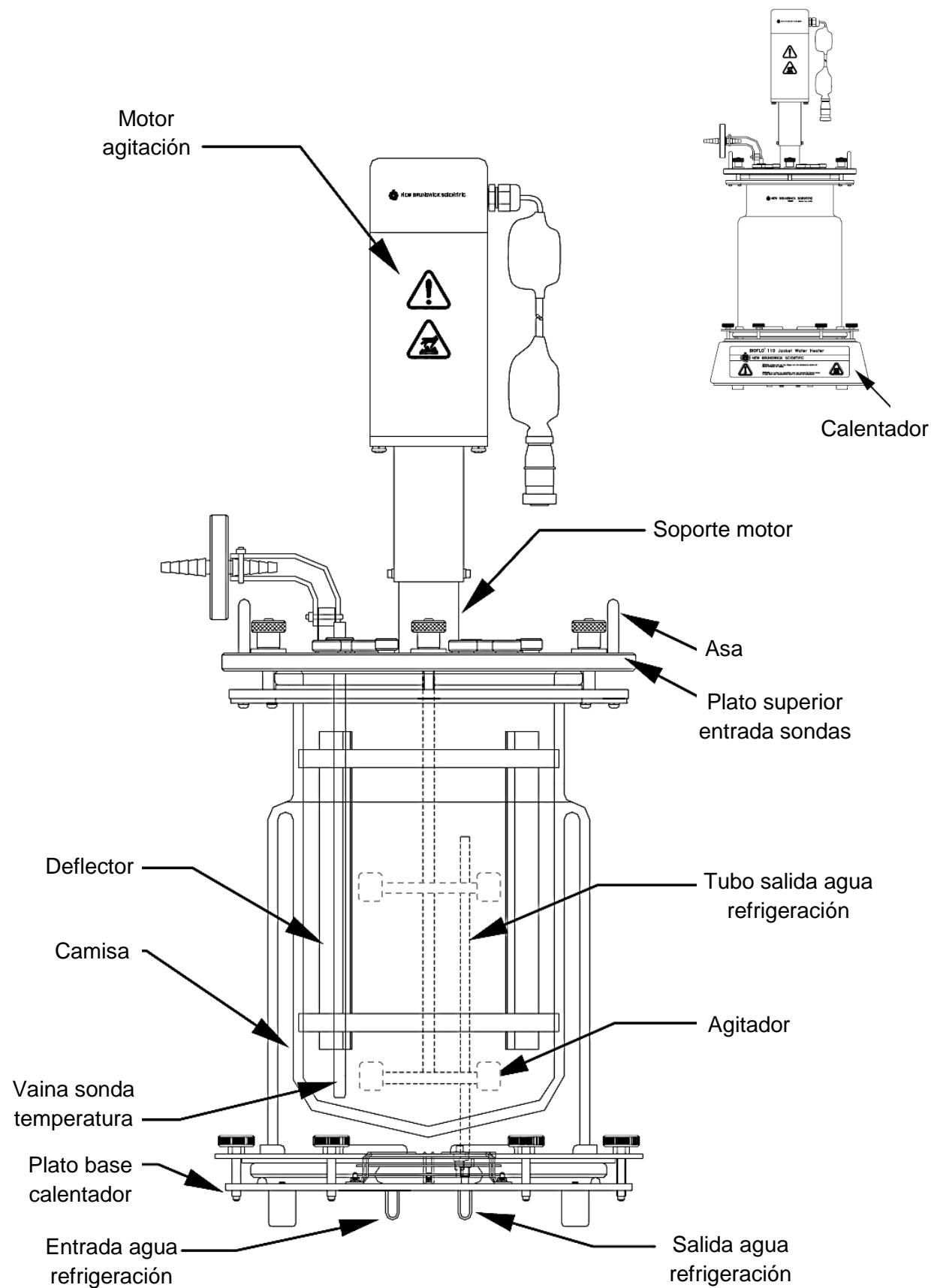


Figura 4.2. Esquema del BioFlo 110 (fuente: manual equipo modificado)

Centrifuga para tubos Falcon refrigerada

Centrifugar muestras en tubos tipo Falcon de 15 mL en refrigeración. Fabricante Orto Alresa modelo Digicen 20-R.

Espectrofotómetro VIS

La determinación del crecimiento microbiano así como la medida analítica de los azúcares, procesos que se detallan en sus respectivos apartados 4.4.1.2 y 4.4.2. Fabricante Unicam modelo Helios Epsilon.

Cromatógrafo de gases inyección automática

El análisis del etanol por cromatografía de gases con automuestreador para 16 viales y detector FID. Las condiciones específicas utilizadas se detallan en su correspondiente ver apartado 4.4.3. Fabricante Agilent Technologies modelo 7820A GC.

Cromatógrafo de gases inyección manual

El análisis del lindano por cromatografía de gases con detector de captura electrónica (ECD). Las condiciones específicas utilizadas se detallan en su correspondiente apartado 4.5.2. Fabricante HP modelo 5890 Serie II.

Microscopio óptico con cámara digital y cámara de recuento celular Bürker

La determinación del número total de microorganismos. Se manejó un microscopio óptico de campo claro con cámara digital acoplada para captura de imágenes junto con una cámara de recuento celular Bürker. Fabricante microscopio: Optika modelo B-350. Fabricante cámara digital: Optika modelo 4083.B5. Fabricante cámara de recuento: Brand modelo Bürker.

pH-metro

El ajuste del pH en el preinóculo. Fabricante CRISON modelo GLP 21.

Agitadores magnéticos y vórtex

La agitación de disoluciones y tubos respectivamente.

Micropipetas, pipetas y dispensadores

La medición de distintos volúmenes. Se manejó un juego de 4 micropipetas (5000, 1000, 100, 10 µL).

Estufa

La determinación del peso seco celular así como el secado de material de vidrio. Fabricante Raypa modelo DO-90.

Baño de ultrasonidos

La disolución de solutos y limpieza de material de vidrio.

Baño de agua

La preparación del preinóculo y el análisis de la glucosa.

Balanzas

La pesada de distintos solutos tanto en balanza granataria como en balanza analítica.

Material de vidrio

El manejo de distintos volúmenes. Matraces aforados, Erlenmeyers, probetas, tubos de ensayo, embudos decantadores, pipetas...

4.3 Protocolo de fermentación

4.3.1 Preparación del preinóculo e inoculación

El preinóculo es el cultivo celular que se realiza para inocular el biorreactor con una determinada cantidad del mismo con el fin de que se inicie el bioprocreso.

Siguiendo el protocolo descrito en el *Anexo 1. Protocolo de preparación del preinóculo*, se preparó el preinóculo 12 horas antes de la inoculación del biorreactor. Las condiciones de cultivo del preinóculo serán las mismas condiciones del experimento que se vaya a llevar a cabo en el biorreactor. En nuestro caso, para la incubación del preinóculo en la cámara de cultivo, el pH inicial siempre se ajustará a 4, como se verá en el apartado 4.3.2, y la temperatura será la que se fije para ese determinado experimento.

Se inocula el biorreactor para obtener una concentración del 2% (v/v) en inóculo (Govindaswamy & Vane, 2007; Mojović, Nikolić, Rakin, & Vukasinović, 2006) a través del puerto de inoculación (septum) con un embudo de vidrio previamente esterilizado. Es decir, para un volumen de trabajo de 5 L, que ha sido el utilizado en todos los experimentos en el biorreactor, se añadieron 100 mL del preinóculo.

4.3.2 Disoluciones correctoras del pH

En las levaduras, los valores de pH comprendidos entre 3 y 6 son la mayoría de las veces favorables al crecimiento y actividad fermentativa. Se eligió un pH constante de 4 para todos los experimentos. El motivo de esta elección es que la cepa utilizada de *Saccharomyces cerevisiae* es de vinificación y está enfocada a fermentar mosto, que presenta un pH generalmente comprendido entre 3 y 3,9, debido a su elevado contenido en ácido tartárico, málico y cítrico principalmente (Pardo, 2003; Ward & Calvo Rebollar, 1991).

Las soluciones correctoras del pH utilizadas son ácido cítrico 0,1 M y bicarbonato sódico 0,1 M.

4.3.3 Preparación del biorreactor

Los pasos generales a seguir para tener el biorreactor listo antes de cada experimento de fermentación son:

1. Limpieza del biorreactor. Generalmente se parte del biorreactor con el caldo de cultivo del experimento anterior con la fermentación acabada. Lo primero es retirar dicho caldo de cultivo para proceder a la limpieza según las instrucciones que facilita el fabricante del biorreactor. En los experimentos con lindano, se incluye un aclarado de los elementos con acetona diluida en agua 1:2.
2. Llenado del biorreactor con el medio de cultivo. Una vez realizada la limpieza y con todos los elementos homogeneizados con agua destilada se procede a la preparación del medio de cultivo (apartado 4.1.2) y al llenado del biorreactor con el mismo. Se ha trabajado en todos los experimentos a un volumen de 5 L.
3. Calibración de la sonda de pH. Se calibra con las soluciones de calibración de pH 4 y 7. Se siguen las instrucciones del equipo.
4. Esterilización del biorreactor. Con el biorreactor lleno con el medio de cultivo y con todas las sondas de medición y control colocadas (excepto la de temperatura que solo se autoclava la vaina) se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos, siguiendo todas las instrucciones y consejos de precaución que se detallan en el manual del equipo. Además también se esterilizan a la vez las disoluciones del ácido y de la base así como todos los viales de recogida de muestras que se vayan a emplear.

5. Selección de las condiciones de operación. Una vez terminada la esterilización y cuando la temperatura del equipo haya descendido lo suficiente como para poder manipularlo se saca del autoclave y se realizan las conexiones con los módulos de control. Posteriormente se seleccionan las condiciones de agitación, temperatura y pH del experimento que se vaya a llevar a cabo esa semana.
6. Polarización y calibración de la sonda de oxígeno disuelto (OD). Cuando se han alcanzado las condiciones de operación se procede a la polarización y posterior calibración de la sonda de oxígeno disuelto (OD). Teóricamente en la calibración, para establecer la mínima cantidad de oxígeno disuelto y calibrar así al 0 % de saturación, se hace pasar nitrógeno a través del sistema de aireación del biorreactor, comentado en el apartado 4.2.1. Posteriormente, para establecer el 100 % de saturación se somete a burbujeo con aire. Ambas corrientes deben pasar por un filtro adecuado antes de introducirse en el biorreactor. Un truco ampliamente utilizado para calibrar el mínimo es establecer el 0 % con la sonda de OD desconectada momentáneamente. Para el resto de detalles se ha procedido según el manual del equipo.

En este momento el biorreactor ya está listo para su inoculación tal y como se indica en el apartado 4.3.1.

Se recomienda encarecidamente leer con detenimiento el manual del biorreactor antes de su utilización ya que se está manipulando un equipo caro y muy delicado.

4.3.4 Sistema de monitorización y control

El sistema de monitorización se basa en la conexión de los módulos de control del biorreactor a un ordenador que registra los datos a través del software *BioCommand*.

Los parámetros que se han monitorizado a lo largo del tiempo han sido:

- Temperatura.
- pH.
- Oxígeno disuelto (OD).

La temperatura y el pH se han registrado en nuestro caso para confirmar que los valores establecidos para las condiciones de operación (apartado 4.3.3) se

mantienen constantes a lo largo del experimento, lo que indica que el control está actuando adecuadamente.

Aunque estamos trabajando en condiciones anaerobias sin aporte de oxígeno, se ha monitorizado el oxígeno disuelto (OD) para observar su evolución con el tiempo, ya que al principio del experimento siempre existe una cantidad inicial de oxígeno disuelto (OD) en el medio de cultivo.

El sistema de control se basa en los aspectos comentados en el apartado 4.2.1 para la descripción de biorreactor.

4.3.5 Toma de muestras

La evolución del crecimiento microbiano así como del sustrato y producto se ha determinado a partir de muestras extraídas del biorreactor a lo largo del tiempo. El intervalo de muestreo, durante toda la duración del experimento, ha sido de 1 hora, excepto por la noche que no se han obtenido muestras.

De forma general en cada muestreo se ha recogido un volumen aproximado de 10 mL que se ha repartido para determinar (ver apartado 4.4):

- Número total de células
- Absorbancia para peso seco celular
- Sustrato: Glucosa
- Producto: Etanol

De manera excepcional se ha recogido un volumen mayor de muestra (30 mL aproximadamente) en aquellos experimentos que se ha determinado directamente el peso seco celular (ver apartado 4.4.1.2) así como el análisis del lindano (ver apartado 4.5.2).

Para la recogida de muestras general se ha seguido el protocolo de muestreo detallado en el *Anexo 2. Protocolo de toma de muestras*.

4.4 Medidas biológicas

4.4.1 Determinación del crecimiento microbiano

La determinación del crecimiento microbiano se puede realizar a partir de métodos directos o de métodos indirectos.

Los métodos directos consisten en realizar la determinación sobre el número de células, la masa de células seca o húmeda, el volumen de células empaquetadas o la turbidez del cultivo. En ocasiones no es posible realizar una medida directa por la

presencia de sólidos suspendidos u otros compuestos que interfieren en el medio de cultivo. Los métodos indirectos se basan en medir la formación de producto, la evolución del calor o la composición celular (Doran, 1998; Shuler & Kargi, 2014).

En este trabajo se ha determinado el crecimiento microbiano a través del número de células y del peso seco celular. A su vez el peso seco celular se ha calculado mediante una relación con la turbidez del medio (absorbancia).

4.4.1.1 Número de células

El objetivo es calcular el número de células por unidad de volumen, generalmente en millones de células por mililitro. Se puede determinar generalmente de tres formas distintas según queramos distinguir entre células viables o no viables.

Conteo directo con el microscopio mediante un hemocitómetro o cámara de recuento celular. El conteo puede ser manual o mediante un sistema automático. Se puede aplicar algún tipo de tinción para distinguir entre viables y no viables.

Por otro lado, se puede realizar un conteo de colonias en placas Petri. El método consiste en diluir adecuadamente el caldo de cultivo, sembrar en placas Petri con un medio adecuado en agar e incubar hasta el crecimiento de colonias. Este método supone que de una sola célula viable se forma una colonia. Distingue por tanto únicamente células viables (Alan, 1999).

El método utilizado en la realización de este trabajo es el de conteo directo automático al microscopio mediante cámara de recuento celular sin tinción. Por tanto no distinguimos entre células viables y no viables.

El microscopio óptico utilizado (ver apartado 4.2.2) es de campo claro y posee una cámara digital acoplada para captura de imágenes.

El hemocitómetro o cámara de recuento celular que se ha utilizado para el recuento automático es de tipo Bürker de cuadrícula doble y con pinzas. Se trata de un portaobjetos que tiene marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas. Cuando se cubre con el cubreobjetos el espacio que queda entre el portaobjetos y el cubreobjetos es de 0,1 mm. La cuadrícula de recuento está formada por 9 cuadrados grandes de 1 mm de arista, que a su vez están divididos en 16 cuadrados pequeños de arista 0,2 mm. Cuando se observa al microscopio (en conteo manual) se cuentan las células que hay en varios cuadrados iguales de la cuadrícula, se calcula la media y así se determinan las células por unidad de área, y como la altura también es conocida se obtienen finalmente las células por unidad de volumen. En la Figura A 1 del Anexo 3

se pueden observar las dimensiones de uno de los 9 cuadrados grandes comentados de la cámara de recuento así como su aspecto general.

Para el sistema automático de conteo se ha necesitado un software de captura de imagen y otro de procesamiento de imagen. El software de captura de imágenes utilizado ha sido OptikaView versión 7.1 desarrollado por el fabricante del microscopio. El software de procesamiento de las imágenes ha sido ImageJ versión 1.50b que es un software libre. Con el primero únicamente se han obtenido las imágenes y con el segundo se han tratado para determinar el número de células que hay en cada imagen capturada.

Debido a que cada experimento suponía la adquisición de 85 imágenes y cada imagen se tenía que procesar individualmente, se recurrió a la implantación de una macro de conteo automática asociada a ImageJ desarrollada por Ivan V. Grishagin de la Universidad de California (Grishagin, 2015). Dicha macro se modificó para obtener un conteo óptimo que se ajustara a la calidad de nuestras imágenes capturadas. Finalmente se calculó el área que se observa en las imágenes con ImageJ y como la altura de la cámara de conteo es conocida (0,1 mm) se determinó el número de células totales por unidad de volumen.

Todos los pasos anteriormente comentados se detallan en el *Anexo 3. Protocolo de determinación del número total de microorganismos*.

La muestra que se utilizó para la determinación del número total de células se recogió según el apartado 4.3.5.

4.4.1.2 Relación absorbancia y peso seco celular

El peso seco celular es el método más usado para medir el crecimiento microbiano. Consiste en secar volúmenes conocidos de caldo de cultivo lentamente hasta peso constante previo lavado de las células. El lavado de las células consiste en centrifugar la muestra para separar el medio de cultivo y resuspender las células en agua destilada para su posterior secado. El objetivo es evitar el error que introducimos al secar las células junto con un medio de cultivo que varía su composición frente al tiempo. Además obtendríamos un peso después del secado que no correspondería únicamente a las células secas (Alan, 1999).

En los casos en que las células no sedimenten fácilmente por centrifugación, como es el caso de células bacterianas, se filtran volúmenes conocidos de cultivo celular mediante filtros adecuados. Las células retenidas en el filtro se lavan con agua

destilada y finalmente los filtros se secan junto con las células retenidas en ellos (Rice, Sullivan, & Helbert, 1980).

Sea cual sea el caso, el resultado se suele expresar en gramos de células secas por litro (g/L).

Es importante añadir que en medios de cultivo que presentan sólidos en suspensión hay que corregir el peso seco medido con respecto al peso de los sólidos, ya que no suele ser posible separar con exactitud los sólidos de las células por centrifugación o filtración. Los medios de cultivo con sólidos en suspensión son comunes a nivel industrial.

La principal desventaja de la determinación del crecimiento celular por peso seco es que es un método lento y sujeto a error si no se usan volúmenes de muestra relativamente grandes (Shuler & Kargi, 2014).

Por otro lado, otro método muy utilizado es el de la turbidez o densidad óptica (absorbancia). Se basa en la capacidad que poseen las células suspendidas en un medio de cultivo líquido de absorber radiación electromagnética visible (luz). La intensidad de luz absorbida (absorbancia) está relacionada directamente con el número de células, aunque también puede influir el tamaño y la forma de estas. Se mide con un espectrofotómetro del espectro visible a longitudes de onda de entre 600 y 700 nm generalmente. Lo adecuado es utilizar una longitud de onda que minimice la absorbancia del medio de cultivo. Para establecer el blanco algunos autores utilizan agua destilada (Alcón Martín, 1999) y otros el propio medio de cultivo estéril libre de células (Villar Moreno, 1992).

Al igual que para el método anterior los sólidos en suspensión pueden resultar un problema así como otros componentes que también absorban cerca de la longitud de onda utilizada (Shuler & Kargi, 2014).

Es muy práctico y común que la absorbancia se relacione linealmente con el peso seco celular (Govindaswamy & Vane, 2007). Dicho procedimiento consiste en medir la absorbancia y el peso seco celular en distintas muestras a lo largo de un experimento de cultivo. De esta manera se obtendrá la ecuación de una recta que podemos utilizar en experimentos en los que intervengan el mismo microorganismo y medio de cultivo en condiciones similares, para que con tan solo medir la absorbancia podamos calcular el peso seco celular (Alan, 1999).

Es importante calcular la relación en toda la extensión del experimento ya que a valores de absorbancia altos puede ser que la relación empiece a ser no lineal. Posteriormente en otros experimentos las muestras que se salgan del intervalo lineal

se diluirán para obtener un valor de absorbancia que podamos interpolar en nuestra relación lineal.

La relación absorbancia peso seco ahorra mucho tiempo y trabajo ya que la medición de la absorbancia es rápida e instantánea mientras que la determinación del peso seco celular es muy lenta e implica mucha más dedicación.

En este trabajo se ha relacionado la absorbancia medida a 660 nm usando agua destilada como blanco (Alcón Martín, 1999; Govindaswamy & Vane, 2007) con el peso seco celular calculado según el *Anexo 4. Protocolo de determinación del peso seco celular*.

La relación experimental que se ha obtenido se muestra en la ecuación (1). Se ha utilizado para calcular el peso seco celular a partir de la absorbancia en todos los experimentos realizados. Se ha calculado a partir del ajuste a una recta por mínimos cuadrados de los puntos que se representan en el gráfico de la Figura 4.3 obteniendo un coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) de 0,9864.

$$\text{Peso seco celular } \left(\frac{g}{L}\right) = 0,9642 \cdot A_{660} + 0,0125 \quad (1)$$

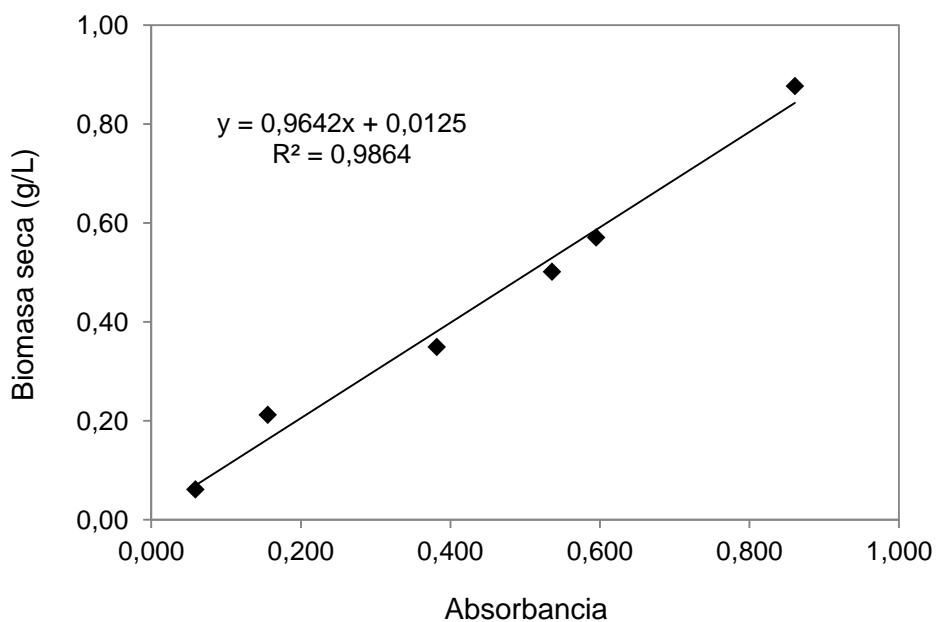


Figura 4.3. Gráfico de relación absorbancia y peso seco celular o biomasa seca
(fuente: elaboración propia)

Los datos de peso seco y absorbancia que se muestran en la Figura 4.3 se obtuvieron en un experimento de fermentación en el biorreactor a 30 °C y pH 4 con el

microorganismo y medio de cultivo descritos en los apartados 4.1.1 y 4.1.2 respectivamente.

El intervalo de absorbancia ensayado en el cual podemos interpolar para obtener el peso seco celular dentro del rango lineal es 0,035 - 0,860.

4.4.2 Análisis del sustrato: Glucosa

El método analítico utilizado para analizar la evolución de la glucosa en los experimentos ha sido el método del fenol-ácido sulfúrico para la determinación total de hidratos de carbono (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). Como el único hidrato de carbono presente en nuestros experimentos es la glucosa (ver apartado 4.1.2) el método utilizado es adecuado para observar su consumo.

Los hidratos de carbono reaccionan por la combinación de ácidos fuertes y altas temperaturas para producir diversos derivados del furano que en presencia de fenol generan compuestos coloreados útiles para su análisis por espectrofotometría de absorción molecular (Nielsen, 2009). Dichas reacciones están impulsadas por el calor producido al añadir ácido sulfúrico a una muestra acuosa (Nielsen, 2007).

El método detecta todas las clases de hidratos de carbono pero la absorvedad de cada uno es diferente en el resultado final. Por ello, a menos que se conozca que la muestra solo contiene un tipo de carbohidrato (nuestro caso), se expresarán los resultados arbitrariamente en términos de un hidrato de carbono dado. Es decir, la recta de calibrado necesaria para la cuantificación se elaborará con un tipo de carbohidrato determinado.

La glucosa analizada por este procedimiento presenta su pico de mayor absorbancia a 490 nm (Dubois et al., 1956).

Este método es sencillo, rápido, sensible, exacto, específico para los hidratos de carbono y ampliamente utilizado. Además, los reactivos que se emplean son baratos, fáciles de obtener y estables. El color que se produce en la reacción es estable durante varias horas y los resultados son reproducibles. Bajo las condiciones apropiadas este método es exacto hasta un $\pm 2\%$ (Nielsen, 2007).

La recta de calibrado que se ha utilizado para la cuantificación del consumo de glucosa por este método en todos los experimentos es la que se muestra en la Figura 4.4 y está elaborada con D(+)-glucosa. El coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) obtenido es de 0,9978. La expresión (2) muestra la ecuación de la recta ajustada utilizada despejada adecuadamente.

El protocolo seguido para la elaboración de la curva de calibrado así como para el análisis de las muestras recogidas en el biorreactor durante el experimento se detalla en el *Anexo 5. Protocolo de análisis de glucosa*.

$$\text{Concentración glucosa } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs} - 0,0184}{0,0199} \quad (2)$$

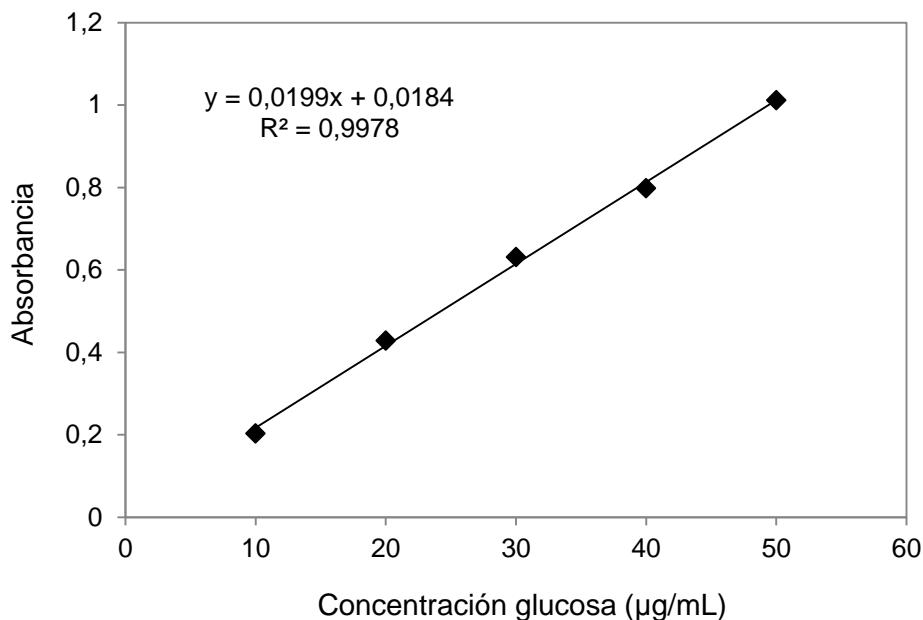


Figura 4.4. Recta de calibrado glucosa método fenol-sulfúrico (fuente: elaboración propia)

El intervalo de concentración de glucosa lineal ensayado (patrones) para el que se puede interpolar con la ecuación (2) es 10-50 μg/mL con un intervalo de absorbancia de 0,203-1,011. Por ello todas las muestras analizadas han sido diluidas adecuadamente para su determinación.

4.4.3 Análisis del producto: Etanol

La determinación del etanol se ha llevado a cabo por el método analítico instrumental de cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID).

El etanol es excretado por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como producto asociado directamente a su metabolismo energético en la fermentación anaerobia (ver apartado 4.6.4) (Doran, 1998).

La cromatografía de gases es una técnica analítica instrumental que permite separar, identificar y cuantificar compuestos afines en una mezcla. Para ello se hace pasar el analito (gas o líquido volátil) en forma gaseosa a través de una columna que contiene una fase estacionaria (líquido no volátil o sólido), arrastrado por una fase móvil gaseosa inerte.

La muestra se inyecta en el inyector en el cual se evapora rápidamente. Ese vapor generado es arrastrado por el gas portador inerte (fase móvil gaseosa) a través de la columna donde los analitos se van separando, llegando a un detector a distintos tiempos (tiempo de retención) cuando salen de la columna. La separación se produce por la distinta afinidad de los analitos por la fase estacionaria, que es función de la polaridad.

La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que se eluyan (salgan de la columna) en un tiempo razonable. Por este motivo la columna se encuentra dentro de un horno que controla su temperatura. A su vez el detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa.

Al final de la columna se coloca un detector que proporciona una señal analítica que se registra de forma continua y varía en función del tiempo conforme salen de la columna los analitos. Se obtiene una gráfica denominada cromatograma (ver Figura 4.5) que nos permite identificar y cuantificar los componentes separados (picos) (Harris, 2001).

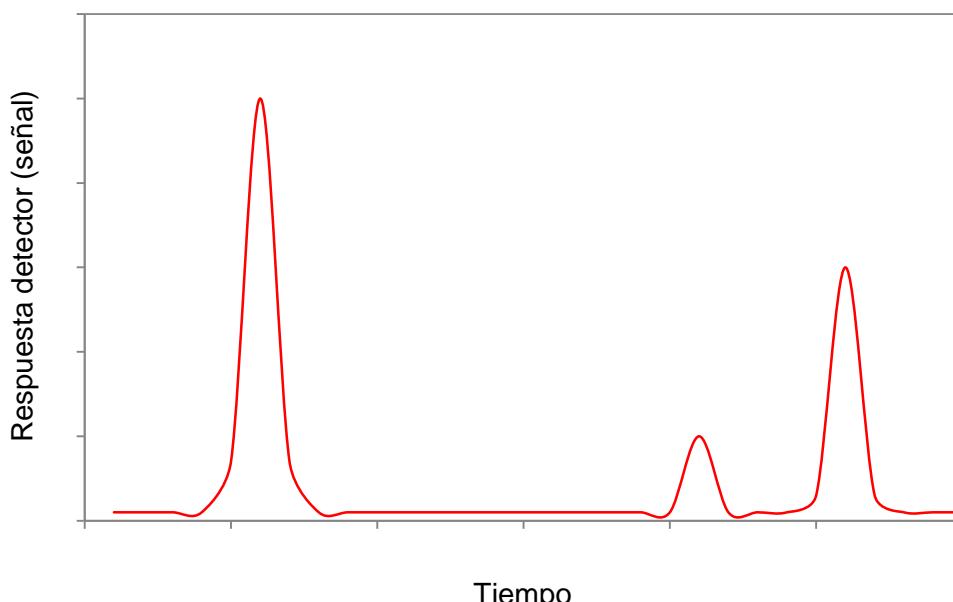


Figura 4.5. Ejemplo genérico de un cromatograma (fuente: elaboración propia)

Para la identificación (análisis cualitativo) de un pico se puede comparar su tiempo de retención con el de una muestra auténtica del compuesto que se sospecha, en varias columnas de distintas polaridades.

La cuantificación (análisis cuantitativo) se basa en el área del pico cromatográfico en la mayoría de los casos. Se suelen escoger condiciones en la que la respuesta es lineal, es decir, cuando el área del pico es proporcional a la cantidad de ese componente (recta de calibrado). Aunque lo más común es utilizar el área, en ocasiones si los picos son muy estrechos se puede sustituir el área por la altura del pico. Tanto el área del pico como su altura se miden automáticamente con un ordenador. (Harris, 2001).

Las distintas condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de etanol en nuestras muestras para los experimentos sin lindano se indican en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones cromatográficas empleadas en los experimentos sin lindano

Volumen de inyección	1 µL
Columna (fase estacionaria)	Agilent 19091J-413 HP-5 30 m x 320 µm x 0,25 µm
Gas portador (fase móvil)	Helio
Flujo columna	2 mL/min
Razón de división (Split)	8:1
Temperatura inyector	200 °C
Temperatura horno	Inicial 55 °C durante 1 min
	Rampa 2 °C/min hasta 60 °C durante 0 min
	Rampa 30 °C/min hasta 160 °C durante 5 min
Temperatura detector	300 °C
Replicas	2

En la determinación del etanol en los experimentos con lindano se cambiaron algunas de las condiciones cromatográficas (temperatura del horno) ya que se observó que quedaban componentes retenidos en la columna entre inyecciones. Las condiciones empleadas se muestran en la Tabla 4.2.

En el análisis de las muestras en cada experimento se pincharon los patrones para la recta de calibrado. Es decir, se obtuvo una recta de calibrado por cada análisis.

En la Figura 4.6 se muestra el ejemplo de una recta de calibrado para un experimento dado ajustando por mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) resultante ha tenido un valor muy próximo a la unidad en todas las determinaciones de etanol.

Tabla 4.2. Condiciones cromatográficas empleadas en los experimentos con lindano

Volumen de inyección	1 μ L
Columna (fase estacionaria)	Agilent 19091J-413 HP-5 30 m x 320 μ m x 0,25 μ m
Gas portador (fase móvil)	Helio
Flujo columna	2 mL/min
Razón de división (Split)	8:1
Temperatura inyector	200 °C
Temperatura horno	Inicial 53 °C durante 1 min
	Rampa 2 °C/min hasta 60 °C durante 0 min
	Rampa 30 °C/min hasta 200 °C durante 10 min
Temperatura detector	300 °C
Replicas	2

La ecuación (3) muestra la expresión genérica del ajuste a la recta despejado, que se ha utilizado para determinar el porcentaje de etanol (v/v).

$$\text{Concentración etanol (\%)} v/v = \frac{\text{Area media} + \text{Ordenada en el origen}}{\text{Pendiente}} \quad (3)$$

Para el análisis de las muestras así como para elaborar la recta de calibrado se ha seguido el protocolo detallado descrito en el *Anexo 6. Protocolo de análisis de etanol*.

Aunque en la Figura 4.6 visualmente parezca que la recta pasa por el origen de coordenadas se puede comprobar en la ecuación del ajuste que no es así por su término independiente.

El intervalo de concentración aproximada de los patrones empleados es 0,01-0,8 % etanol v/v. La señal obtenida para todas las muestras analizadas se ha podido interpolar directamente sin necesidad de realizar ningún tipo de dilución previa.

Como se puede ver en la Tabla 4.1 y Tabla 4.2 se realizaron dos réplicas de cada muestra y patrones, es decir dos pinchazos. De esta manera se calculó el área media antes de aplicar la ecuación (3) o realizar el ajuste de la recta de calibrado.

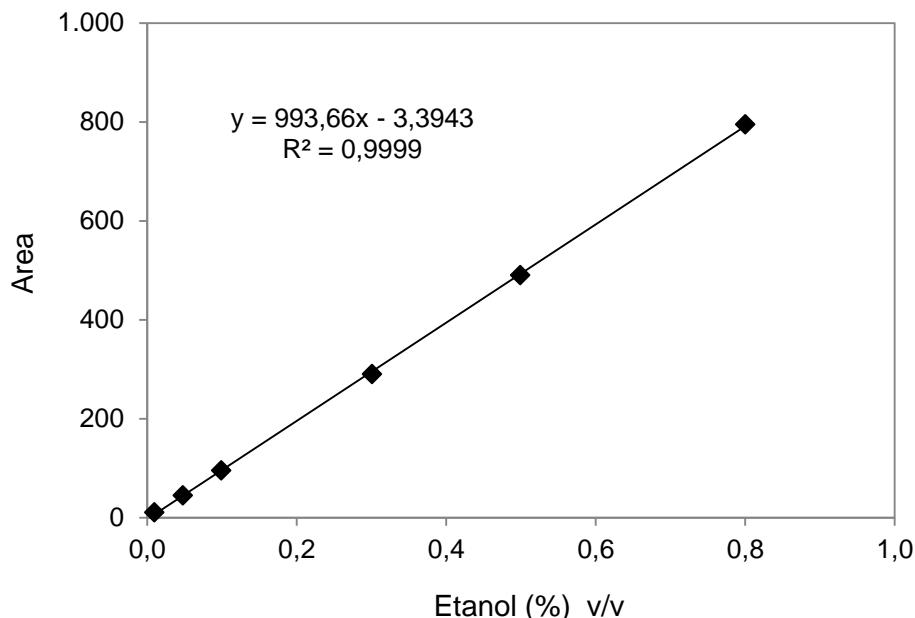


Figura 4.6. Ejemplo de recta de calibrado de etanol para un experimento dado (fuente: elaboración propia)

4.5 Fermentación con lindano

4.5.1 Dopaje del biorreactor

La contaminación del medio de cultivo con lindano se realizó a partir de disoluciones madre concentradas de lindano en agua estéril.

La solubilidad del lindano en agua es de 7,3 mg/L a 25 °C (Richardson & Miller, 1960). Mientras que a 35 °C aumenta hasta 11,4 mg/L (Biggar & Riggs, 1974).

Se han preparado disoluciones madre a 5 mg/L aproximadamente en agua estéril a 35 °C. Para ello se ha pesado en balanza analítica una determinada cantidad de lindano en función del volumen a preparar. Se ha transvasado el soluto a un matraz aforado junto con agua destilada estéril a 35 °C hasta el enrase y se ha colocado en el baño de ultrasonidos durante 30 minutos para la completa disolución del soluto. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se volvió a enrasar con agua

destilada estéril, ya que como antes se enrasó a 35 °C el volumen había disminuido al enfriarse. Finalmente se transvasó la disolución a un frasco de vidrio y se mantuvo en un baño de agua a 35 °C.

A partir de estas disoluciones se contaminó el medio de cultivo, después de la esterilización en el biorreactor, con una cantidad determinada en función de la concentración de lindano que requiera el experimento (ver apartado 4.8).

Como se puede observar se ha sido conservador en la concentración de lindano en la disolución madre, es decir, no hemos apurado hasta el límite de solubilidad a 35 °C ya que queríamos asegurar la estabilidad del lindano en disolución (evitar precipitación), debido a que los experimentos en el biorreactor fueron a una temperatura más baja.

4.5.2 Análisis del lindano

La determinación del lindano en las muestras se ha llevado a cabo por el método analítico instrumental de cromatografía de gases (GC) con detector de captura electrónica (ECD) previa extracción líquido-líquido en hexano.

La extracción es el proceso de pasar un soluto de una fase a otra. Las razones más frecuentes por las que se usa una extracción en química analítica son aislar, concentrar o separar un analito de una especie que interferiría en su análisis. El caso más frecuente es la extracción de una disolución acuosa con un disolvente orgánico. Se utilizan frecuentemente disolventes como el éter dietílico, el tolueno y el hexano, que son inmiscibles en agua y menos densos que ésta. Todos ellos forman una fase separada por encima de la fase acuosa. Entre los disolventes más densos que el agua se suelen encontrar el cloroformo, el diclorometano y el tetracloruro de carbono. Así pues en una extracción tenemos una mezcla de dos fases, una predominantemente acuosa y la otra predominantemente orgánica (Harris, 2001).

La cromatografía de gases es una técnica analítica instrumental cuyo principio básico para el análisis ya se ha comentado en el apartado 4.4.3.

Las condiciones cromatográficas empleadas para analizar el lindano disuelto en hexano tras la extracción líquido-líquido se muestran en la Tabla 4.3.

En el análisis de las muestras en cada experimento con lindano se pincharon los patrones para la recta de calibrado. Es decir, se obtuvo una recta de calibrado por cada análisis. En la Figura 4.7 se muestra el ejemplo de una recta de calibrado para un experimento dado ajustando por mínimos cuadrados, con un coeficiente de correlación al cuadrado cercano a la unidad.

La ecuación (4) muestra la expresión genérica del ajuste a la recta despejado, que se ha utilizado para determinar la concentración de lindano en hexano. Posteriormente se han tenido que realizar los cálculos adecuados para conocer la concentración de lindano en la muestra sometida a extracción.

Tabla 4.3. Condiciones cromatográficas para el análisis de lindano en hexano.

Volumen de inyección	1 μ L
Columna (fase estacionaria)	Agilent 19091J-433 HP-5 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m
Gas portador (fase móvil)	Nitrógeno
Flujo columna	No se especifica
Razón de división (Split)	No se especifica (ajuste manual)
Temperatura inyector	280 °C
Temperatura horno	Inicial 120 °C durante 3 min
	Rampa 30 °C/min hasta 190 °C durante 0 min
	Rampa 5 °C/min hasta 240 °C durante 5 min
Temperatura detector	300 °C
Replicas	3

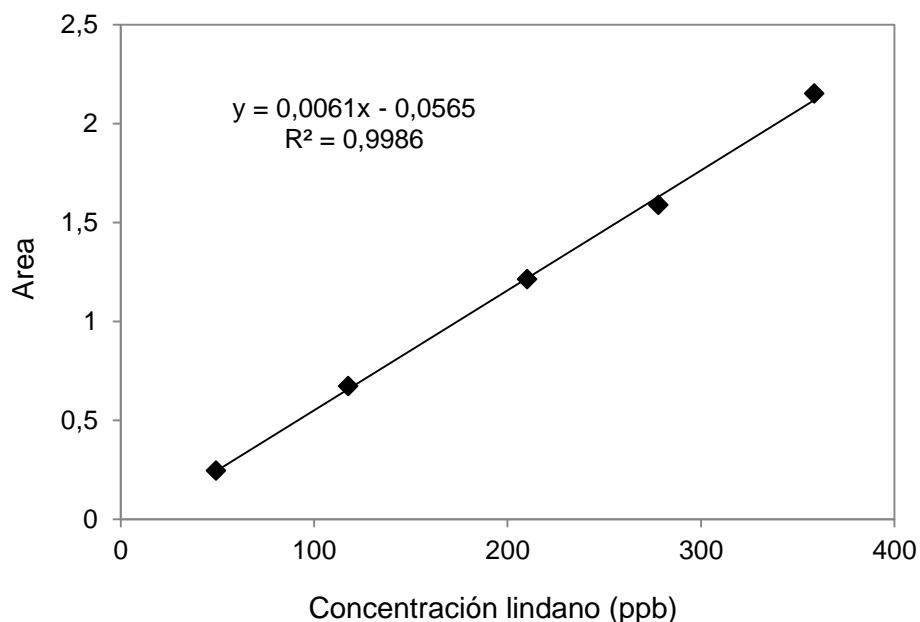


Figura 4.7. Ejemplo de recta de calibrado de lindano en hexano para un experimento dado (fuente: elaboración propia)

$$\text{Concentración lindano (ppb)} = \frac{\text{Area media} + \text{Ordenada en el origen}}{\text{Pendiente}} \quad (4)$$

El intervalo de concentración aproximada de los patrones es 50-350 ppb de lindano en hexano.

Como se puede ver en la Tabla 4.3 se realizaron tres réplicas de cada muestra, es decir tres pinchazos. De esta manera se calculó el área media antes de aplicar la ecuación (4).

Para el análisis de las muestras y sus cálculos así como para elaborar la recta de calibrado se ha seguido el protocolo detallado descrito en el *Anexo 7. Protocolo de análisis de lindano*.

4.6 Crecimiento microbiano

4.6.1 Fermentación discontinua

En un reactor discontinuo, el crecimiento de las células tiene lugar en el interior del reactor, y al no haber una regeneración del medio de cultivo, el crecimiento se detiene cuando llega algún tipo de limitación. Limitaciones típicas son el consumo de un nutriente esencial o la acumulación de algún producto tóxico del metabolismo.

La Figura 4.8 recoge las fases típicas de un crecimiento celular en discontinuo. Las diferentes fases de crecimiento se distinguen más fácilmente cuando se representa el logaritmo de la concentración de células viables frente al tiempo. La velocidad de crecimiento depende de la fase de crecimiento:

- Fase de latencia o adaptación: Comienza inmediatamente después de la inoculación del biorreactor. La velocidad de crecimiento es prácticamente cero. Las células utilizan esta fase para adaptarse al nuevo ambiente, y en ocasiones se sintetizan nuevas enzimas o componentes estructurales.
- Fase de aceleración: Se abandona la fase de latencia ya que las células ya están adaptadas al medio y comienza el crecimiento exponencial.
- Fase de crecimiento: Las células se multiplican rápidamente incrementándose la concentración celular de forma exponencial con el tiempo.
- Fase de deceleración: En esta fase la velocidad de crecimiento va decreciendo a medida que aparecen limitaciones.

- Fase estacionaria: La velocidad de crecimiento se hace prácticamente nula. Cesa el crecimiento.
- Fase de muerte: Se produce la disminución del número de células viables.

Si en vez de representar la concentración de células viables se representa la concentración del número total de células (incluyendo las no viables también) lo que ocurre únicamente es que la fase de muerte no aparecerá, es decir, no se sabe en qué momento cesa la fase estacionaria (Casas Alvero, Gòdia Casablancas, & López Santín, 1998; Doran, 1998; Shuler & Kargi, 2014).

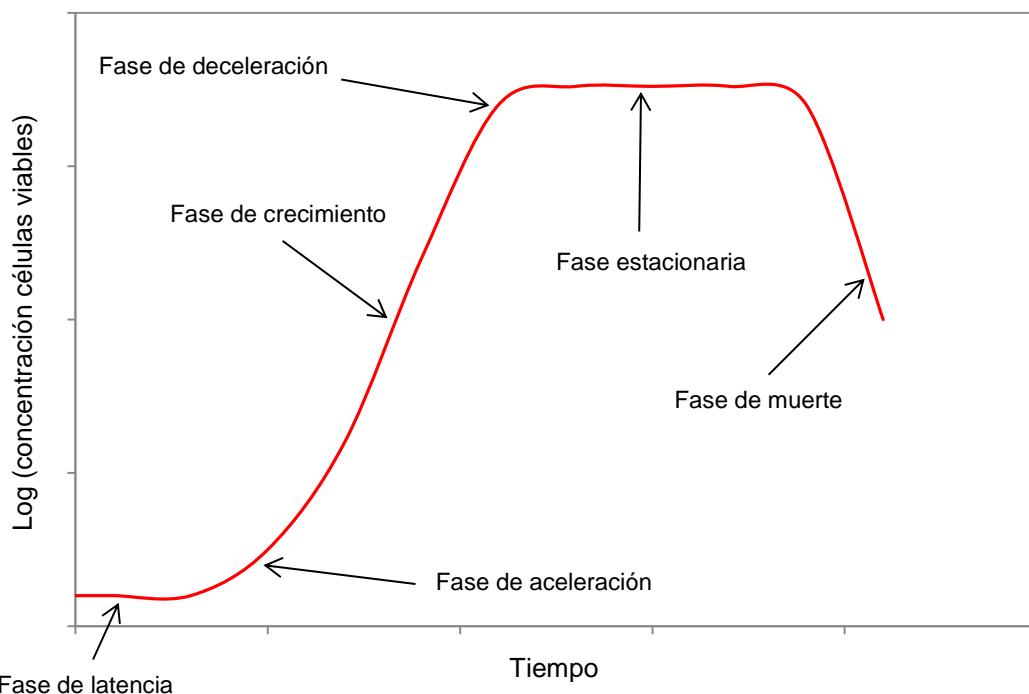


Figura 4.8. Fases del crecimiento celular en reactor discontinuo (fuente: elaboración propia)

4.6.2 Velocidades específicas y rendimientos

4.6.2.1 Cinética de crecimiento celular

La velocidad de crecimiento en un cultivo celular requiere para su cálculo la medición de la concentración de células en el tiempo (ver apartado 4.4.1) y se describe mediante la siguiente expresión (5):

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (5)$$

Donde:

- r_X es la velocidad volumétrica de producción de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).
- X es la concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Las unidades indicadas para los parámetros anteriores son las que más se utilizan, y de aquí en adelante son las que se utilizarán. La masa de las células (biomasa) se expresa en peso seco generalmente tal y como se vio en el apartado 4.4.1.2.

Como se puede observar en la ecuación (5) el crecimiento celular puede considerarse como una reacción autocatalítica de primer orden.

La velocidad específica de crecimiento μ depende de la concentración de nutrientes en el medio. Casi siempre, un único sustrato ejerce un efecto dominante sobre la velocidad de crecimiento. A dicho componente se le denomina sustrato limitante del crecimiento. El sustrato limitante del crecimiento es a menudo la fuente de carbono o nitrógeno. El modelo cinético más comúnmente utilizado, y que con frecuencia también forma parte de modelos más complejos, es la ecuación de Monod (6), que describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \quad (6)$$

Donde:

- S es la concentración de sustrato limitante del crecimiento ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1}).
- K_S es la constante de sustrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Los parámetros μ_m y K_S son intrínsecos del sistema célula-sustrato. La velocidad específica máxima de crecimiento μ_m es el valor máximo que puede alcanzar la velocidad de crecimiento, cuando $S \gg K_S$ y las concentraciones del resto de nutrientes no han cambiado de forma notable. La constante de sustrato K_S representa el valor de la concentración de sustrato limitante a la que la velocidad específica de crecimiento μ es la mitad de la máxima μ_m .

Para valores de S inferiores a K_S la velocidad específica de crecimiento μ depende de una forma lineal de S , mientras que para valores superiores se hace independiente de S (Doran, 1998).

El modelo cinético de Monod (6) es muy simple y no siempre presenta una buena correlación con los datos experimentales de crecimiento de un determinado microorganismo. Por ello se han utilizado otros modelos cinéticos que se comentarán en el apartado 4.6.3. Además, debe tenerse en cuenta que en muchos casos el crecimiento celular se encuentra afectado por inhibición por el sustrato o inhibición por el producto, generándose entonces los denominados modelos cinéticos con inhibición.

4.6.2.2 Cinética de formación de producto

La velocidad de formación de producto en un cultivo celular requiere para su cálculo la medición de la concentración del producto en el tiempo (ver apartado 4.4.3) y se describe mediante la siguiente expresión (7):

$$r_P = \frac{dP}{dt} = q_P \cdot X \quad (7)$$

Donde:

- r_P es la velocidad volumétrica de formación de producto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).
- P es la concentración del producto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- q_P es la velocidad específica de formación de producto (h^{-1}).
- X es la concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Los productos de fermentación pueden clasificarse de acuerdo a la relación existente entre la síntesis del producto y la generación de energía en la célula (Roels & Kossen, 1978; Stouthamer & Versteeg, 1985). Existen tres categorías:

- Productos directamente asociados al metabolismo energético: Son los compuestos que excretan las células en su metabolismo energético (rutas de formación de ATP). Por ejemplo el etanol.
- Productos indirectamente asociados al metabolismo energético: Son aquellos compuestos parcialmente asociados a la generación de energía porque requieren un aporte adicional de energía para su síntesis. Por ejemplo el ácido cítrico.

- Productos no asociados al metabolismo energético: Son aquellos compuestos que se forman en rutas muy alejadas del metabolismo energético. Por ejemplo los antibióticos.

Como se puede deducir, la categoría que nos interesa en este trabajo es la primera, ya que el producto excretado por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el etanol.

Es importante destacar dentro de esta categoría, que el crecimiento es generalmente la función celular que más energía requiere, por lo tanto el producto se formará siempre que exista crecimiento. Sin embargo, también se necesita energía en las actividades del mantenimiento celular (movilidad celular, intercambios de componentes celulares, ajuste del pH interno etc.) que realizan las células vivas incluso en ausencia de crecimiento.

La velocidad específica de formación de producto q_P asociado directamente al metabolismo energético viene dada por la ecuación (8).

$$q_P = Y_{PX} \cdot \mu + m_p \quad (8)$$

Donde:

- Y_{PX} es el rendimiento teórico de producto a partir de biomasa ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).
- μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
- m_p es la velocidad específica de formación de producto debido al mantenimiento celular (h^{-1}).

El concepto de rendimiento se tratará con más detalle en el apartado 4.6.2.4.

Si se combinan las expresiones (5), (7) y (8) se consigue la expresión general (9) para la velocidad de formación de producto asociado directamente al metabolismo energético.

$$r_P = \frac{dP}{dt} = Y_{PX} \cdot r_X + m_p \cdot X \quad (9)$$

Como se puede observar en los términos de la ecuación (9) la expresión considera la formación de producto asociada al crecimiento y la asociada a las actividades de mantenimiento celular (Casas Alvero et al., 1998; Doran, 1998).

En este trabajo se ha modificado la ecuación (9) considerando que el término asociado al mantenimiento sigue una dependencia de tipo potencial con la concentración de biomasa, incluyendo un exponente q . La expresión utilizada (10) generaliza el caso anterior, el cual sería un caso particular para $q = 1$.

$$r_P = \frac{dP}{dt} = Y_{PX} \cdot r_X + m_p \cdot X^q \quad (10)$$

4.6.2.3 Cinética de consumo de sustrato

La velocidad de consumo de sustrato en un cultivo celular requiere para su cálculo la medición de la concentración del sustrato en el tiempo (ver apartado 4.4.2) y se describe mediante la expresión (11):

$$(-r_S) = \frac{dS}{dt} = q_S \cdot X \quad (11)$$

Donde:

- $(-r_S)$ es la velocidad volumétrica de consumo de sustrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).
- S es la concentración del sustrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- q_S es la velocidad específica de consumo de sustrato (h^{-1}).
- X es la concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

La cinética de consumo de sustrato se divide en:

- Consumo de sustrato en ausencia de formación de producto: En ausencia de formación de producto se supondrá que todo el sustrato que entra a la célula se utiliza para el crecimiento y las funciones de mantenimiento.
- Consumo de sustrato con formación de producto: El consumo de sustrato dependerá de si la formación de producto está asociada o no al metabolismo energético (ver apartado 4.6.2.2).
 - Cuando se forman productos asociados directamente al metabolismo energético la síntesis del compuesto es consecuencia inevitable del consumo de sustrato que se utiliza para el crecimiento y el mantenimiento celular.

- Cuando el producto no está asociado o parcialmente asociado al metabolismo energético existe un flujo separado de sustrato para la síntesis de producto, además del consumo de sustrato para el crecimiento y mantenimiento.

Como se puede deducir, el tipo de cinética que interesa para este trabajo es la del consumo de sustrato con formación de producto asociado directamente al metabolismo energético, ya que el producto excretado por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el etanol (ver apartado 4.6.2.2).

La velocidad específica de consumo de sustrato q_S con formación de producto asociado directamente al metabolismo energético viene dada por la ecuación (12).

$$q_S = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu + m_S \quad (12)$$

Donde:

- Y_{XS} es el rendimiento teórico de biomasa a partir de sustrato ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).
- μ es la velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).
- m_S es la velocidad específica de consumo de sustrato para actividades del mantenimiento celular (h^{-1}).

El concepto de rendimiento se tratará con más detalle en el apartado 4.6.2.4.

Si se combinan las expresiones (5), (11) y (12) se consigue la ecuación expresión general (13) para la velocidad de consumo de sustrato con formación de producto asociado directamente al metabolismo energético.

$$(-r_S) = \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot r_X + m_S \cdot X \quad (13)$$

Hay que destacar que esta expresión es válida también para la cinética de consumo de sustrato en ausencia de formación de producto como se puede deducir según lo explicado (Casas Alvero et al., 1998; Doran, 1998).

Al igual que en el caso de la cinética de formación de producto, ecuación (10), se ha utilizado la ecuación (14) considerando que el término asociado al mantenimiento sigue también una dependencia de tipo potencial, que incluye un exponente p :

$$(-r_S) = \frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot r_X + m_S \cdot X^p \quad (14)$$

4.6.2.4 Rendimientos

Los rendimientos más utilizados en el ámbito de los cultivos celulares se definen según las ecuaciones (15), (16) y (17).

$$Y_{XS} = \frac{\text{masa o moles de biomasa producida}}{\text{masa o moles de sustrato consumido}} \quad (15)$$

$$Y_{PS} = \frac{\text{masa o moles de producto formado}}{\text{masa o moles de sustrato consumido}} \quad (16)$$

$$Y_{PX} = \frac{\text{masa o moles de producto formado}}{\text{masa o moles de biomasa producida}} \quad (17)$$

Es importante destacar en el ámbito del metabolismo celular que estos rendimientos pueden ser:

- Teóricos: Son esencialmente relaciones estequiométricas. A menudo son difíciles de calcular ya que la estequiometría de la producción de biomasa y de formación de producto se conoce únicamente para fermentaciones relativamente sencillas. Si las rutas son complejas los cálculos estequiométricos llegan a ser demasiado complicados. Normalmente se refieren a un rendimiento máximo posible ya que representan el rendimiento en ausencia de reacciones paralelas.
- Observados: Son los rendimientos calculados a partir de los datos experimentales recogidos para las especies que se relacionan. Normalmente son los únicos rendimientos disponibles. Tienen en cuenta las reacciones simultáneas que se dan en el metabolismo celular. En cuanto a la nomenclatura se suelen distinguir de los teóricos añadiendo una prima (Y').

4.6.3 Modelos cinéticos de crecimiento microbiano

La velocidad específica de crecimiento μ se puede expresar a través de multitud de modelos cinéticos además de Monod. Los utilizados en los ajustes de nuestros datos experimentales se muestran a continuación (Casas Alvero et al., 1998). Se respeta la misma nomenclatura adoptada en apartados anteriores, incluyendo nuevos parámetros empíricos.

Tessier 1

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - e^{\frac{-S}{K_S}}\right) \quad (18)$$

Tessier 2

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - e^{\frac{-S^n}{K_S}}\right) \quad (19)$$

Tessier 3

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - e^{\frac{-S}{K_S}}\right)^n \quad (20)$$

Konak

$$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{b-1}{K_S} \cdot S\right)^{\frac{1}{b-1}}}\right) \quad (21)$$

Moser 1

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S^n}{K_S + S^n} \quad (22)$$

Moser 2

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right)^n \quad (23)$$

Contois 1

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{B \cdot X + S} \quad (24)$$

Contois 2

$$\mu = \mu_m \cdot \left(\frac{S}{B \cdot X + S} \right)^n \quad (25)$$

Webb 1

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S \cdot \left(1 + \frac{\beta \cdot S}{K_{iS}} \right)}{K_S + S \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{iS}} \right)} \quad (26)$$

Webb 2

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S \cdot \left(1 + \frac{S}{4 \cdot K_S} \right)}{K_S + S \cdot \left(1 + \frac{S}{4 \cdot K_S} \right)} \quad (27)$$

El modelo de inhibición por producto que hemos considerado se presenta en la ecuación (28) a través del modelo de Monod, pero el término exponencial que multiplica (factor de inhibición) se puede combinar con todos los modelos comentados anteriormente. Se ha elegido este modelo ya que fue desarrollado para la cinética de inhibición por producto debida al etanol (Aiba, Shoda, & Nagatani, 2000).

Aiba

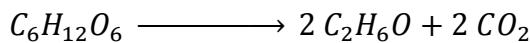
$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S} \cdot e^{\frac{-P}{K_P}} \quad (28)$$

4.6.4 Fermentación alcohólica y balance de materia

Aproximadamente el 96 % de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o especies relacionadas, durante su metabolismo anaerobio. El etanol se produce en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) cuya reacción global es la siguiente:



Expresado en fórmula molecular



El rendimiento teórico de 1 g de glucosa es de 0,51 g de etanol y 0,49 g de dióxido de carbono. Sin embargo, en la práctica, aproximadamente el 10 % de la glucosa se transforma a biomasa y el rendimiento en etanol y dióxido de carbono alcanzan el 90 % del valor teórico (rendimiento observado). Además también se genera ATP ya que el etanol es un producto asociado al metabolismo energético como se ha visto en el apartado 4.6.2.2 (Ward & Calvo Rebollar, 1991).

Con esta información, a pesar de no medir el dióxido de carbono producido en nuestro ensayo, se ha cerrado un balance de materia al biorreactor en los ajustes de los datos experimentales a los modelos, para cada experimento.

La materia se conserva durante los procesos químicos y físicos ordinarios. Si consideramos que nuestro sistema es el biorreactor podemos aplicarle la ecuación general del balance de materia (29) (Díaz, 2012).

$$E - S + G - C = A \quad (29)$$

Donde:

- E masa que entra a través de los límites del sistema.
- S masa que sale a través de los límites del sistema.
- G masa generada dentro del sistema.
- C masa consumida dentro del sistema.
- A masa acumulada dentro del sistema.

Durante la fermentación no entra masa al sistema ya que estamos en un reactor discontinuo y la cantidad de disolución correctora del pH que es introducida se considera despreciable. La masa que sale del sistema en la toma de muestras no se tiene en cuenta en relación con el volumen total del biorreactor.

La masa generada corresponde principalmente a la biomasa, el etanol y el dióxido de carbono. Este último se estima por su relación estequiométrica con el etanol. La masa consumida se supone que únicamente pertenece a la glucosa, pues al ser una fermentación anaerobia el oxígeno no interviene y, así mismo, puede considerarse despreciable el consumo de peptonas como fuente de nitrógeno.

4.6.5 Efecto de la temperatura en la cinética celular

La temperatura ejerce un marcado efecto sobre la velocidad metabólica. La temperatura tiene una influencia directa sobre la velocidad de reacción de acuerdo a la ley de Arrhenius, además de poder cambiar la configuración de los constituyentes celulares, especialmente las proteínas y los componentes de membrana. La expresión (30) representa la ecuación de Arrhenius.

$$k = A \cdot e^{\frac{-Ea}{R \cdot T}} \quad (30)$$

Donde:

- k es una constante cinética.
- A es la constante de Arrhenius.
- Ea es la energía de activación.
- R es la constante de los gases ideales.
- T es la temperatura absoluta.

De manera aproximada puede decirse que la velocidad específica de crecimiento μ se duplica por cada 10 °C de aumento de la temperatura, hasta que empieza a producirse la rotura estructural de proteínas y lípidos celulares. Otras constantes cinéticas también presentan una dependencia de la temperatura del tipo Arrhenius (Doran, 1998).

Se ha realizado una reparametrización de la ecuación (30) con el fin de obtener una convergencia adecuada en los ajustes experimentales.

Para ello se elige la temperatura media T_m entre las ensayadas obteniéndose que:

$$k_m = A \cdot e^{\frac{-Ea}{R \cdot T_m}} \quad (31)$$

Combinando las ecuaciones (30) y (31) se obtiene que:

$$k = k_m \cdot e^{-Ea \cdot VT}$$

donde $VT = \frac{T_m - T}{R \cdot T \cdot T_m}$ (32)

4.7 Cálculo de los parámetros cinéticos

Dado que los modelos cinéticos quedan formulados en forma de un sistema de ecuaciones diferenciales lineales (ODEs) y algebraicas, que no tiene solución analítica, se han utilizado métodos numéricos para calcular la evolución de la concentración de biomasa, sustrato y producto con el tiempo. Debido a su simplicidad y suficiente precisión, se ha utilizado el método de Euler, dado que, en el presente caso, permite obtener la misma precisión que otros métodos de orden superior, como los de Runge-Kutta.

4.7.1 Ajuste y discriminación de modelos

Para el ajuste de los datos experimentales a los distintos modelos planteados en el apartado 4.6.3 se ha utilizado como “Función Objetivo” a maximizar, el denominado Criterio de Selección de Modelos (*CSM*) (33) definido como:

$$CSM = \ln\left(\frac{SRT}{SRC}\right) - 2\frac{p}{n} \quad (33)$$

Donde los términos *SRT* y *SST* vienen dados por:

$$SRT = \sum_{i=1}^n (y_{obs_i} - \bar{y}_{obs})^2 \quad (34)$$

$$SRC = \sum_{i=1}^n (y_{obs_i} - y_{cal_i})^2 \quad (35)$$

Y siendo

- p es el número de variables de decisión.
- n es el número total de datos observados.
- y_{obs_i} dato observado i .
- y_{cal_i} dato calculado i .

Si se compara el ajuste obtenido con varios modelos, el más significativo es el que da un valor mayor del *CSM*.

El coeficiente R^2 para el ajuste viene dado por la ecuación (36).

$$R^2 = 1 - \frac{SRT}{SRC} \quad (36)$$

El cálculo y maximización del *CSM* se ha realizado mediante el complemento Solver® de Microsoft Office Excel®.

La “Función Objetivo” particularizada (37) es:

$$CSM = \ln\left(\frac{SRT_X}{SRC_X}\right) + \ln\left(\frac{SRT_S}{SRC_S}\right) + \ln\left(\frac{SRT_P}{SRC_P}\right) - 2\frac{p}{n} \quad (37)$$

Se indica mediante los subíndices *X*, *S* y *P* el conjunto de datos para la biomasa, el sustrato y el producto respectivamente.

El modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales es aquel que presenta el valor más alto del *CSM*.

Así mismo, para el análisis estadístico de los parámetros calculados a partir del Solver, se ha utilizado la macro Solver Statistics de Excel (Billo, 2011), que devuelve las desviaciones estándar de los parámetros, según una distribución t-student inversa, con un nivel de confianza del 95%.

4.7.2 Cálculo del efecto de la temperatura de reacción

Una vez ajustadas las constantes cinéticas para un determinado modelo según el apartado 4.7.1 en cada temperatura ensayada, se ha procedido a realizar un ajuste global. Es decir, se ha maximizado con el complemento Solver®, la función objetivo (38) siendo las variables de decisión las constantes cinéticas para todas las temperaturas ensayadas y restringidas a la no negatividad.

$$CSM_{global} = \sum CSM_T \quad (38)$$

El subíndice *T* indica la temperatura del experimento para el cual se calcula el *CSM* de un determinado modelo cinético.

Posteriormente, basándonos en la ecuación de Arrhenius (32), se ha representado *k* frente a *VT* y se ha realizado un ajuste exponencial en Excel para cada constante cinética, observando así su relación con la temperatura según Arrhenius. Así obtenemos la energía de activación (*Ea*) para cada constante cinética.

Obsérvese que para el ajuste con Solver únicamente se tienen en cuenta las ecuaciones que dependen de la variable tiempo (t), por ello podemos denominar a este ajuste monovariable.

Por otro lado se ha realizado un ajuste multivariable. El ajuste multivariable se basa en estimar las constantes cinéticas de los modelos teniendo en cuenta a la vez las variables tiempo (t) y temperatura (T). Es decir, se ha maximizado con el complemento Solver, la función objetivo (38) siendo las variables de decisión la energía de activación (Ea) y la constante media (k_m) de la ecuación de Arrhenius (32), para cada constante cinética de los modelos y restringidas a la no negatividad.

Con este método se fuerza a las constantes cinéticas a ajustarse cumpliendo la ecuación de Arrhenius. Por ello se le denomina ajuste monovariable y multirespuesta.

4.8 Diseño de experimentos

4.8.1 Experimentos preliminares

Los experimentos preliminares se plantearon para establecer los criterios que permitieron diseñar adecuadamente los experimentos definitivos. Los criterios que se estudiaron son:

- Concentración inicial de sustrato. A nivel de matraz se realizaron fermentaciones en cámara de cultivo a distintas concentraciones de glucosa inicial con el fin de observar su consumo en un tiempo determinado.
- Concentración inicial de inóculo y utilización de preinóculo. Se ensayó en el biorreactor con distintas concentraciones iniciales de levadura seca activa (LSA) por inoculación directa. Los resultados se compararon con otros ensayos realizados en el biorreactor por inoculación indirecta a través del preinóculo.
- Puesta a punto de los protocolos para el seguimiento del proceso. Se adecuaron los procedimientos corrigiendo posibles fuentes de error y se organizó el horario de utilización de los equipos.

Se realizaron un total de 4 experimentos preliminares antes de proceder con los experimentos definitivos. Las conclusiones principales que se obtuvieron para el correcto seguimiento del crecimiento celular fueron:

- Concentración inicial de glucosa de 10 g/L.

- Inoculación indirecta a través de preinóculo. Concentración de LSA 0,4 g/L en matraz de preinóculo.
- Duración de los ensayos de 3 días entre preparación del biorreactor y seguimiento de la reacción. Posibilidad de realizar un único experimento por semana.
- Modificación de aspectos puntuales en los protocolos a seguir.

Por otro lado estos ensayos preliminares sirvieron para afianzar la destreza necesaria para afrontar con garantía los siguientes experimentos definitivos.

4.8.2 Experimentos definitivos

Los experimentos definitivos se diseñaron siguiendo las condiciones de operación que se muestran en la Tabla 4.4 y la Tabla 4.5 para fermentación en ausencia de lindano y en presencia de lindano respectivamente.

Tabla 4.4. Condiciones de operación de fermentación en ausencia de lindano

Experimento (día_mes)	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Glucosa inicial (g·L ⁻¹)	LSA matraz (g·L ⁻¹)
5_04	25	4	100	10	0,4
12_04	30	4	100	10	0,4
19_04	20	4	100	10	0,4
26_04	30	4	100	10	0,4
24_05	35	4	100	10	0,4

Tabla 4.5. Condiciones de operación de fermentación en presencia de lindano

Experimento (día_mes)	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Glucosa inicial (g·L ⁻¹)	LSA matraz (g·L ⁻¹)	Lindano (ppb)
10_05	30	4	100	10	0,4	100
17_05	30	4	100	10	0,4	2000

El valor de concentración de lindano elegido para el primer experimento (10_05) se escogió en base a que es la concentración por encima de la cual se activan

los avisos de contaminación en el muestreo del río Gállego de la provincia de Aragón (Iagua, 2016).

Con la concentración de lindano del segundo experimento (17_05) se pretendía alcanzar un límite máximo con respecto a su solubilidad en el agua.

Los horarios establecidos para el desarrollo del experimento consistieron en inocular el biorreactor a las nueve de la mañana recogiendo muestras cada hora hasta las ocho de la tarde de ese mismo día. A la mañana siguiente se comenzó el muestreo a las ocho y media de la mañana hasta las doce y media del medio día también con una frecuencia de muestreo de una hora.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comparativa experimental global

5.1.1 Fermentación en ausencia de lindano

La comparativa experimental global de los experimentos de fermentación realizados en ausencia de lindano a distintas temperaturas es útil para constatar el marcado efecto que posee la temperatura en el crecimiento celular. Hay que tener en cuenta que el resto de condiciones operacionales se han mantenido constantes entre ensayos (ver Tabla 4.4).

En la Figura 5.1 se puede observar de qué manera ha afectado a la concentración total de células. En las 11 primeras horas de cultivo la diferencia en la pendiente de las curvas es clara. Según lo comentado en el apartado 4.6.1, estamos examinando la típica curva de crecimiento microbiano en la que se distinguen las distintas fases del crecimiento.

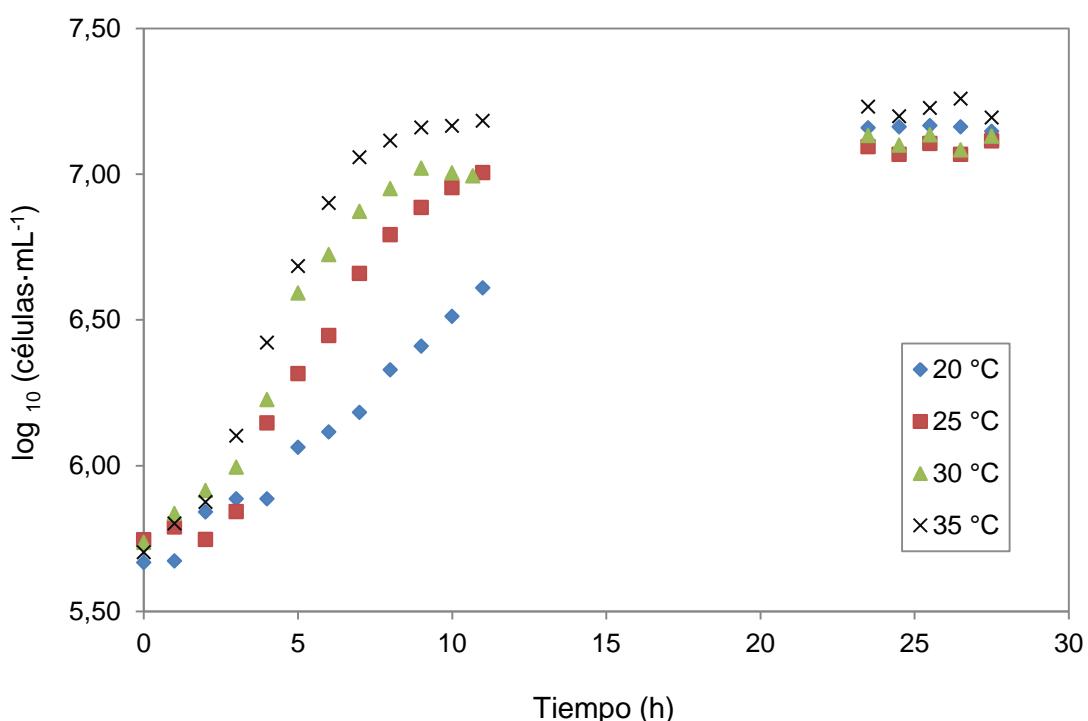


Figura 5.1. Concentración del número total de células frente al tiempo a distintas temperaturas.

Como se puede ver a medida que aumenta la temperatura aumenta la pendiente de la fase de crecimiento exponencial disminuyendo la fase de latencia. Excepto en el experimento a 20 °C, en el resto se ha alcanzado la fase de

deceleración e inicio de la fase estacionaria alrededor de las 11 horas. La fase de deceleración y comienzo de la fase estacionaria se alcanzó para el experimento a 20 °C entre las 11 y 23 horas.

A pesar de las diferencias comentadas, todos los experimentos alcanzaron aproximadamente la misma concentración de células totales en la fase estacionaria, como indican los datos recogidos entre las 23 y 27 horas. Aunque el ensayo a 35 °C presenta valores ligeramente mayores en comparación con el resto.

La Figura 5.2 muestra la evolución de la concentración de biomasa (peso seco celular) respecto al tiempo para las distintas temperaturas ensayadas. Las conclusiones son similares a las expuestas en los párrafos anteriores.

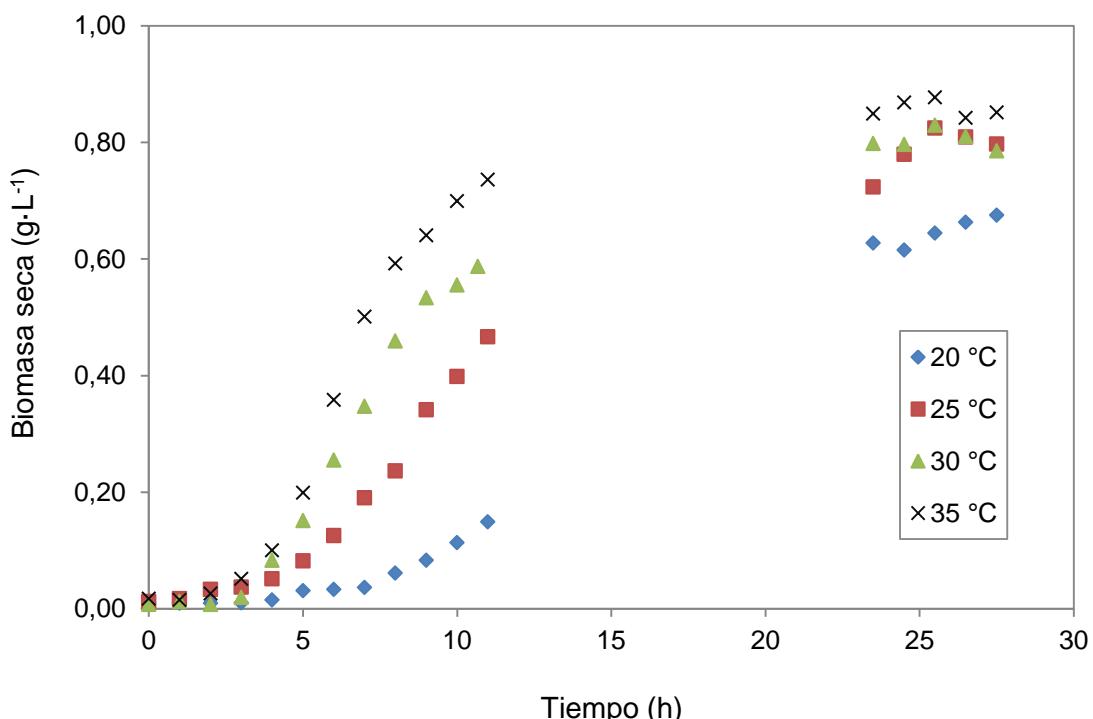


Figura 5.2. Concentración de biomasa seca frente al tiempo a distintas temperaturas.

La producción de biomasa se ralentiza conforme desciende la temperatura. Se comprueba claramente en la concentración conseguida para cada temperatura transcurridas 11 horas. A las 23 horas la concentración ya se ha estabilizado en los experimentos a 30 y 35 °C, mientras que en el resto aún se sigue produciendo biomasa. Este hecho implica que aún queda glucosa por consumir como se comprueba en la Figura 5.3 para el experimento a 20 y 25 °C, siendo más acusado en el primero.

Si se compara la Figura 5.1 con la Figura 5.2 se advierte que entre las 23 y 27 horas la concentración del número total de células es aproximadamente la misma entre experimentos, mientras que la concentración de biomasa no lo es tan claramente, sobre todo en el ensayo a 20 °C. Esto se explica porque en la determinación del número total de células se hace un recuento de todas las levaduras sin distinciones. Pero en un cultivo celular existen células de distinto tamaño y por tanto con distinta masa ya que se mezclan células que acaban de nacer con células que ya han alcanzado su estado de madurez para unas condiciones ambientales determinadas. Por este motivo principalmente, aunque el recuento celular sea mayor no tiene por qué ir acompañado de un correspondiente aumento en el peso celular y viceversa (Ratledge et al., 2009).

El consumo de sustrato de nuestros experimentos a distintas temperaturas se muestra en la Figura 5.3 a través de la evolución de la glucosa con el tiempo.

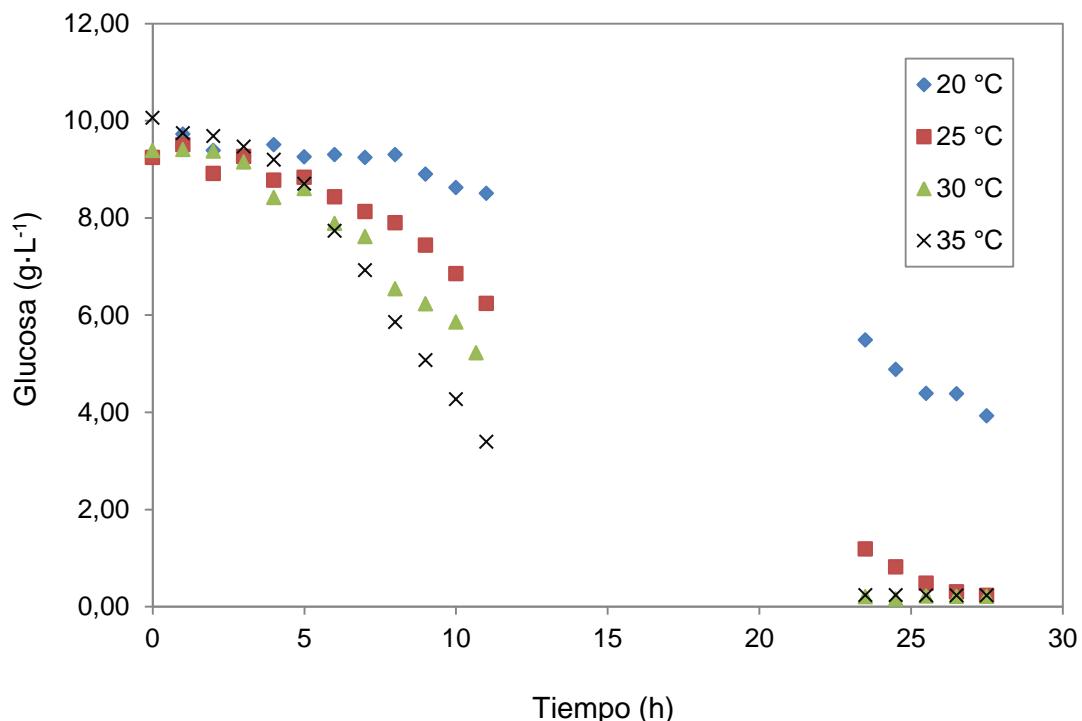


Figura 5.3. Concentración de glucosa frente al tiempo a distintas temperaturas.

Tal y como se ha comentado para el crecimiento celular los resultados en la evolución de la concentración de glucosa son lógicos y concuerdan con los resultados presentados en la Figura 5.1 y Figura 5.2 para cada experimento. El consumo de glucosa aumenta en la fase de crecimiento exponencial debido principalmente a que el crecimiento se incrementa con la temperatura. Por ello, la pendiente más acusada de consumo en las primeras 11 horas se da en los experimentos a 30 y 35 °C. El

experimento a 20 °C se corresponde con el consumo más lento y por tanto con la pendiente menos pronunciada.

La producción de etanol en nuestros experimentos a distintas temperaturas se determina en función de la evolución de la concentración de etanol con el tiempo, como se muestra en la Figura 5.4.

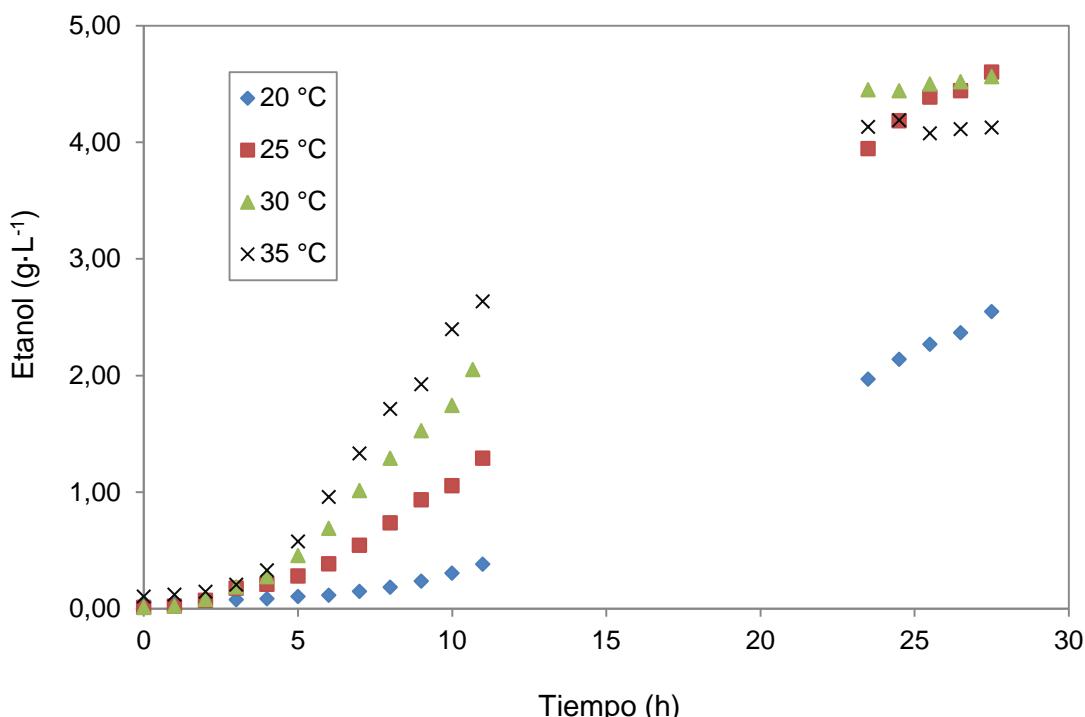


Figura 5.4. Concentración de etanol frente al tiempo a distintas temperaturas.

En condiciones anaerobias, el consumo de glucosa va ligado a la producción de etanol tal y como se vio en el apartado 4.6.4. Por ese motivo el aumento en el consumo de sustrato con la temperatura conlleva un aumento en la velocidad de producción de etanol como se puede ver en las 11 primeras horas.

Por otro lado, exceptuando el experimento a 20 °C, que aún no ha finalizado la fermentación transcurridas 27 horas (aún queda sustrato por consumir), la concentración de etanol final no es exactamente igual para el resto de experimentos, siendo más acusado en el experimento a 35 °C. Según la bibliografía la concentración final de etanol puede disminuir con la temperatura debido a rendimientos menores de producto a partir de sustrato o a sustrato no consumido (Casey & Ingledew, 1986). En el presente caso, en el experimento a 35 °C no queda sustrato por consumir como se puede ver en la Figura 5.3., por ello una posible explicación es que el rendimiento a etanol es más bajo debido a la producción de otros metabolitos (glicerol, ácido acético...) por el efecto del incremento en la temperatura (Torija, 2002).

Otra posible explicación es que una mayor parte de la glucosa se haya desviado a producir biomasa.

Por último, otro motivo puede ser que se hayan producido pérdidas de etanol por evaporación (Torija, 2002).

Mediante las ecuaciones (15) y (16) se han calculado los rendimientos de etanol a partir de glucosa y biomasa a partir de glucosa para cada temperatura ensayada, mostrándose en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Rendimientos de etanol a partir de glucosa a distintas temperaturas.

	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
$Y_{PS} (g \cdot g^{-1})$	0,469	0,491	0,483	0,409
$Y_{XS} (g \cdot g^{-1})$	0,125	0,087	0,085	0,085

Se confirma la disminución del rendimiento a etanol con la temperatura como indica la bibliografía (Torija, 2002) excepto en el rendimiento a 20 °C. Pero hay que hacer notar que este experimento aún no ha finalizado la fermentación con lo que su valor no es comparable con los demás, que son rendimientos globales de una fermentación ya finalizada.

No se confirma que el rendimiento a biomasa sea mayor en el experimento a 35 °C como podría pensarse según las posibilidades comentadas. De hecho el valor mayor lo presenta el experimento a 20 °C que por las mismas razones expuestas en el párrafo anterior no se considera comparable.

5.1.2 Fermentación en presencia de lindano

Los experimentos con lindano se diseñaron según la Tabla 4.5. Se eligió la temperatura de 30 °C ya que como se ha visto en el apartado 5.1.1 ofrece la mayor velocidad de producción de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto, excluyendo el experimento a 35 °C por su bajo rendimiento a etanol con respecto a los demás.

Se han comparado los dos experimentos a distinta concentración de lindano de la Tabla 4.5, con los dos experimentos a 30 °C realizados según la Tabla 4.4. En las siguientes figuras se puede comprobar que la contaminación de lindano en el medio de cultivo no afecta a ningún parámetro de crecimiento observado.

En la Figura 5.5 y Figura 5.6 se constata que el lindano no afecta significativamente a la velocidad de producción de biomasa medida a través de la concentración del número total de células y de la concentración de biomasa (peso seco). Además se alcanza en los cuatro experimentos comparados la misma concentración celular final.

El consumo de sustrato tampoco presenta cambios significativos que indiquen una modificación de la tendencia de los experimentos sin lindano. Aunque en la Figura 5.7 se observen algunas pequeñas diferencias entre los puntos observados, estas tienen que ver con la cantidad exacta inicial de glucosa de la que se parte. La concentración final de glucosa en los cuatro experimentos es la misma como se puede apreciar.

Por último, la formación de producto tampoco presenta cambios significativos. En la Figura 5.8 se observa que la evolución de la concentración de etanol es igual en los cuatro experimentos comparados, aunque presente pequeñas variaciones en los puntos observados entre las 23 y 27 horas, debido posiblemente a las diferencias en la concentración inicial de glucosa.

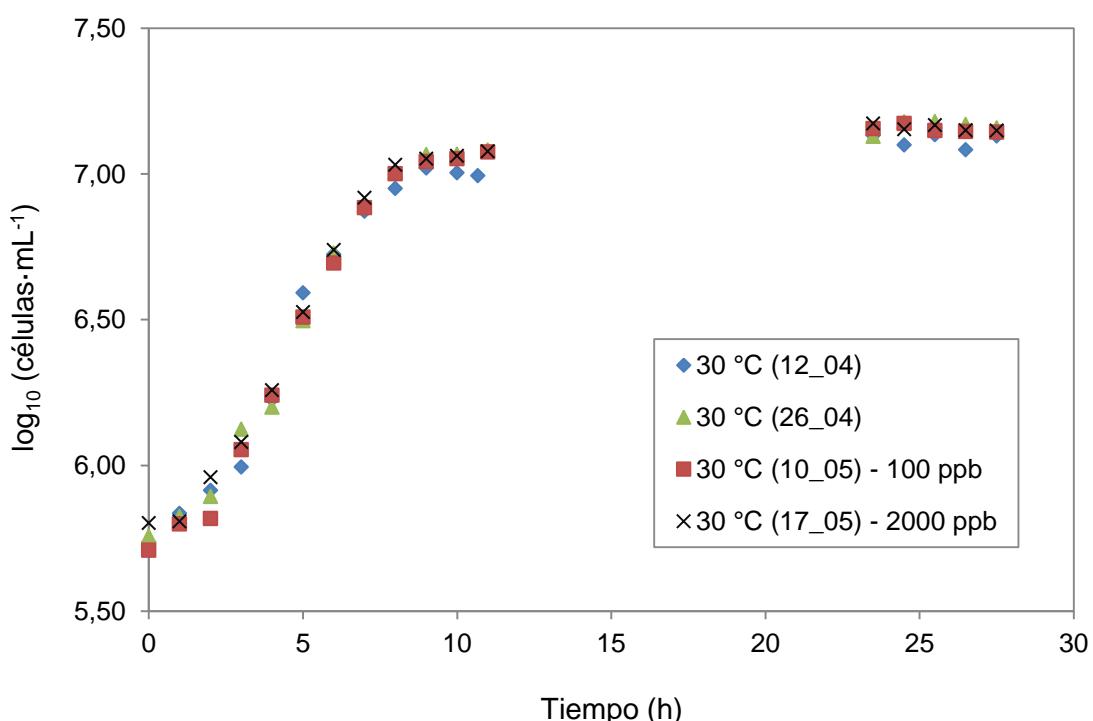


Figura 5.5. Comparación de la concentración del número total de células frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.

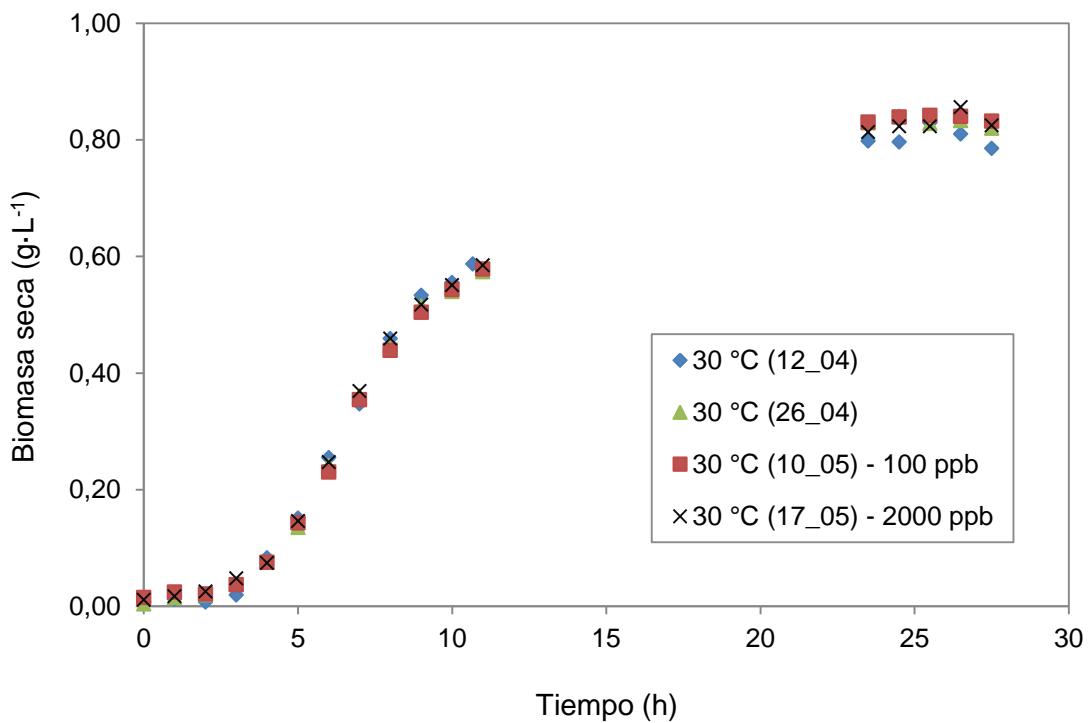


Figura 5.6. Comparación de la concentración de biomasa seca frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.

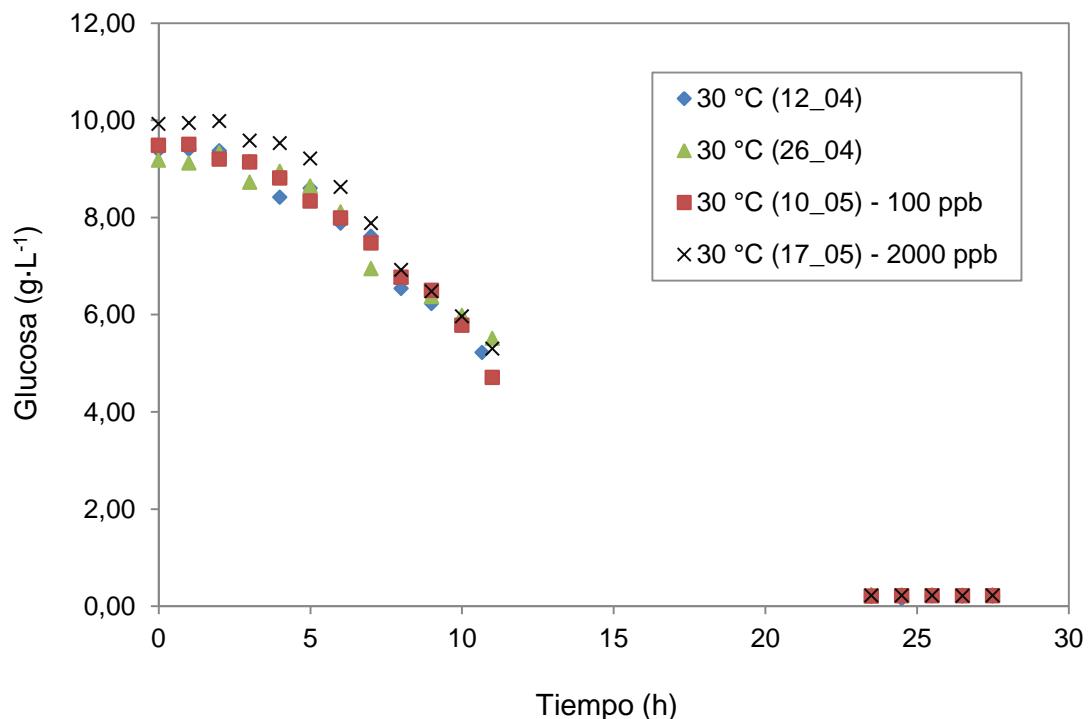


Figura 5.7. Comparación de la concentración de glucosa frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.

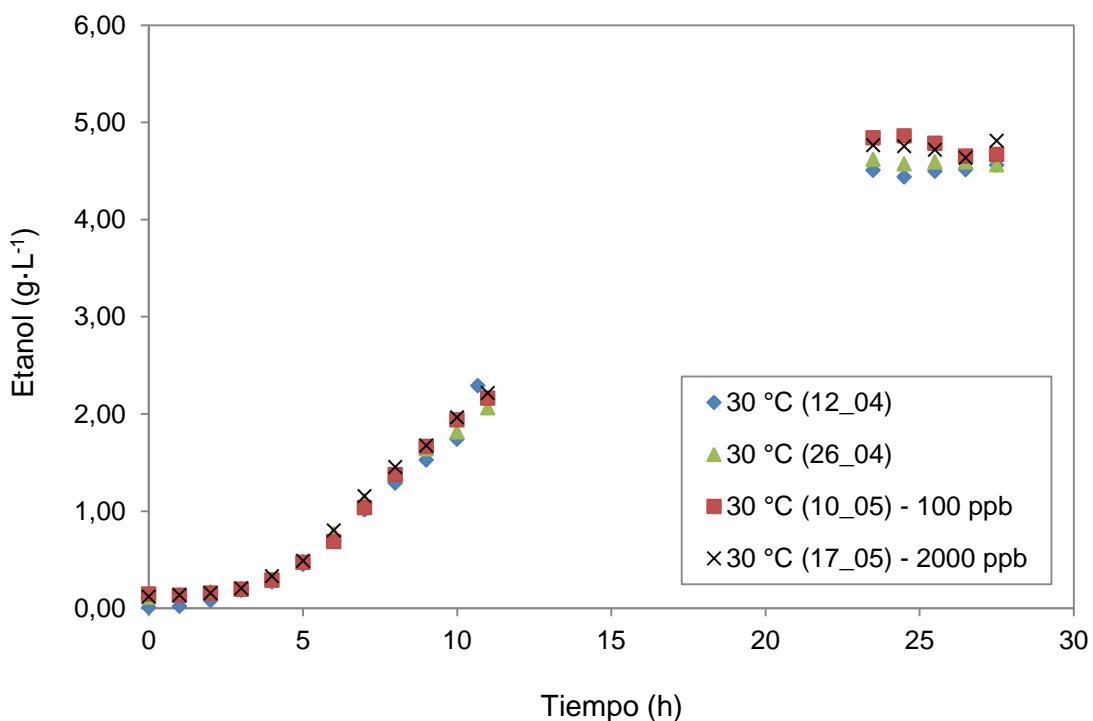


Figura 5.8. Comparación de la concentración de etanol frente al tiempo en experimentos en ausencia de lindano y en presencia de lindano a 30 °C.

Ya que no se han evidenciado modificaciones en los parámetros observados para el crecimiento microbiano se podría pensar que la levadura ha utilizado el lindano como fuente de carbono y energía. Por ello se analizó para cada experimento en presencia de lindano la concentración inicial y la final al cabo de 55 horas de experimento. Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Análisis del lindano antes y después de la fermentación.

Experimento	Concentración teórica (ppb)	Concentración inicial (ppb)	Concentración final (ppb)	Reducción (%)
100 ppb	124,80	100,20 ± 0,27	65,65 ± 3,55	34,18
2000 ppb	2280,00	2658,84 ± 55,13	2009,18 ± 40,34	24,43

Aunque parece existir una reducción del lindano tras la fermentación, se cree que se debe al propio proceso de extracción líquido-líquido empleado para su análisis. En las extracciones de las muestras para la determinación de la concentración final se formaba una interfase entre la fase orgánica y la fase inorgánica que dificultaba la extracción.

Además en el cromatograma obtenido para las muestras finales, no se detectan otros picos distintos al del lindano, lo que nos lleva a pensar que no se han formado otros compuestos organoclorados tras una posible metabolización del mismo por parte de *Saccharomyces cerevisiae*.

De todas formas se deberían realizar más pruebas y análisis en este sentido para aceptar totalmente estas suposiciones. Por ejemplo, analizando también la fase sólida, es decir las células tras la centrifugación previa al análisis del sobrenadante en las muestras de caldo de cultivo recogidas tras la fermentación.

Por último, es importante hacer notar la buena reproducibilidad conseguida en los experimentos comparados a 30 °C.

5.2 Comparación de los modelos cinéticos

Se ha procedido al ajuste de los datos experimentales de las tres variables respuesta (X, S y P) obtenidos en cada experimento, a los distintos modelos cinéticos presentados en el apartado 4.6.3.

Antes del ajuste de los datos experimentales se procedió a estimar los puntos pertenecientes al intervalo de 11 a 23 horas (datos correspondientes a la noche) a través de un modelo sigmoidal empírico para el crecimiento celular, completado con el balance de materia realizado al biorreactor.

Aunque se ha realizado un ajuste de este tipo para cada uno de los experimentos de la Tabla 4.4 solo se muestran los resultados para uno de los dos experimentos a 30 °C, para no alargar la extensión de este trabajo. Concretamente el experimento que se presenta a continuación es el 26_04.

En la Tabla 5.3 se muestran los parámetros cinéticos ajustados para los modelos comentados con inhibición Aiba, así como el valor resultado de maximizar la función objetivo y sus coeficientes de ajuste al cuadrado. Se puede observar que sus coeficientes de ajuste son cercanos a la unidad en prácticamente todos los modelos testeados, indicando que todos ajustan convenientemente los datos experimentales. Además, los parámetros cinéticos estimados concuerdan en orden de magnitud con los aportados por la bibliografía (Najafpour, 2007).

En la Figura 5.9, Figura 5.10 y Figura 5.11 se plasman los ajustes de la producción de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto respectivamente a través de los principales modelos testeados, indicando la buena correlación existente entre los datos observados y los datos calculados para todos los modelos.

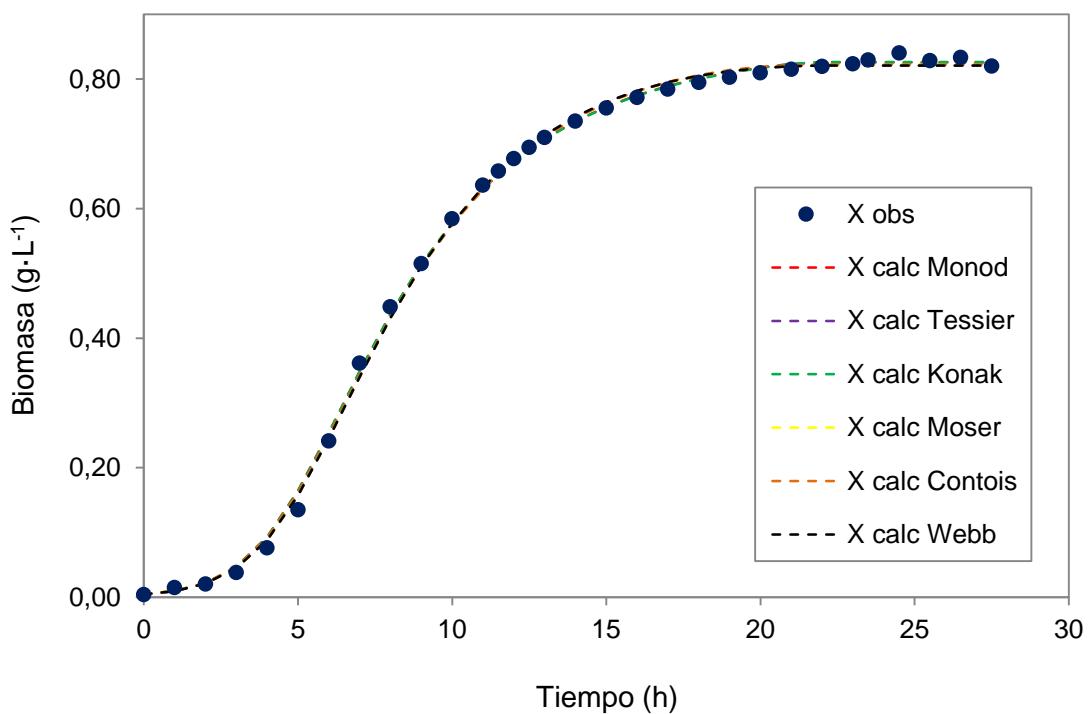


Figura 5.9. Ajuste de la concentración de biomasa a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.

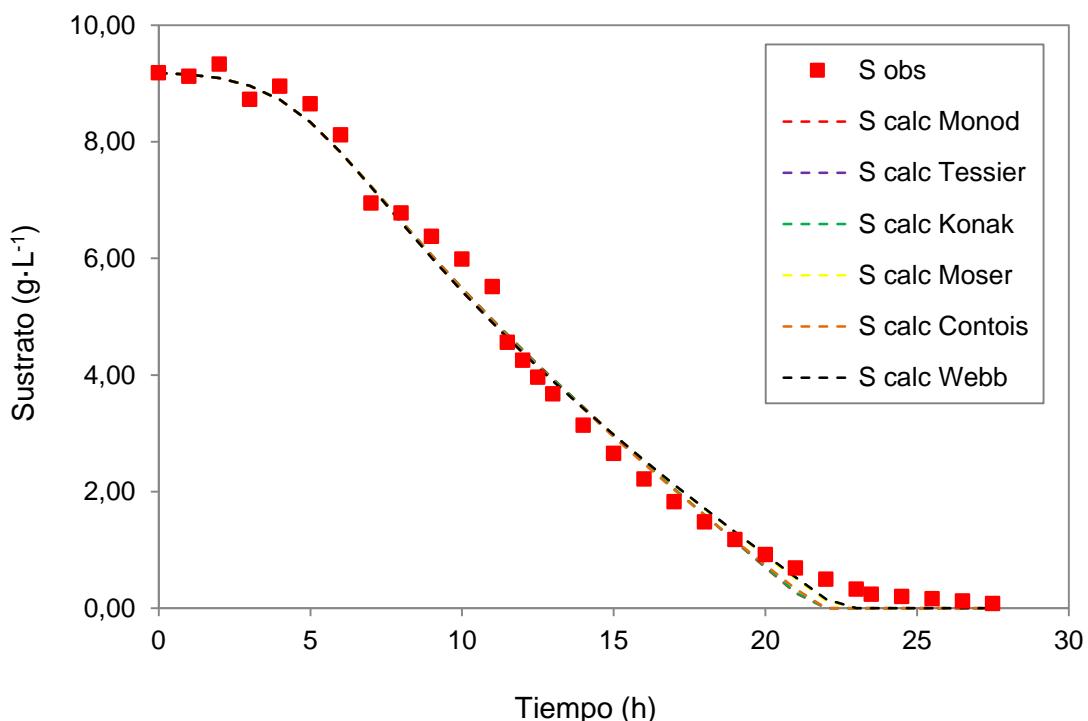


Figura 5.10. Ajuste de la concentración de sustrato a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.

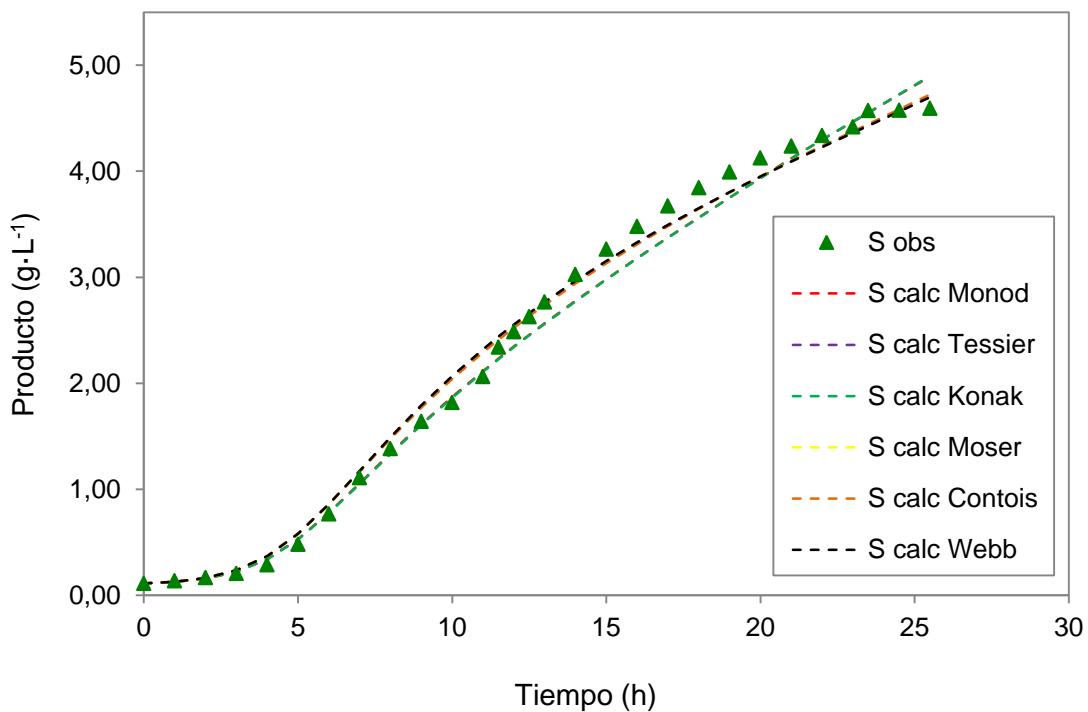


Figura 5.11. Ajuste de la concentración de producto a través de los principales modelos testeados (con inhibición Aiba), a 30 °C.

A continuación se muestra un ejemplo de los ajustes individuales para el modelo de Tessier con inhibición Aiba.

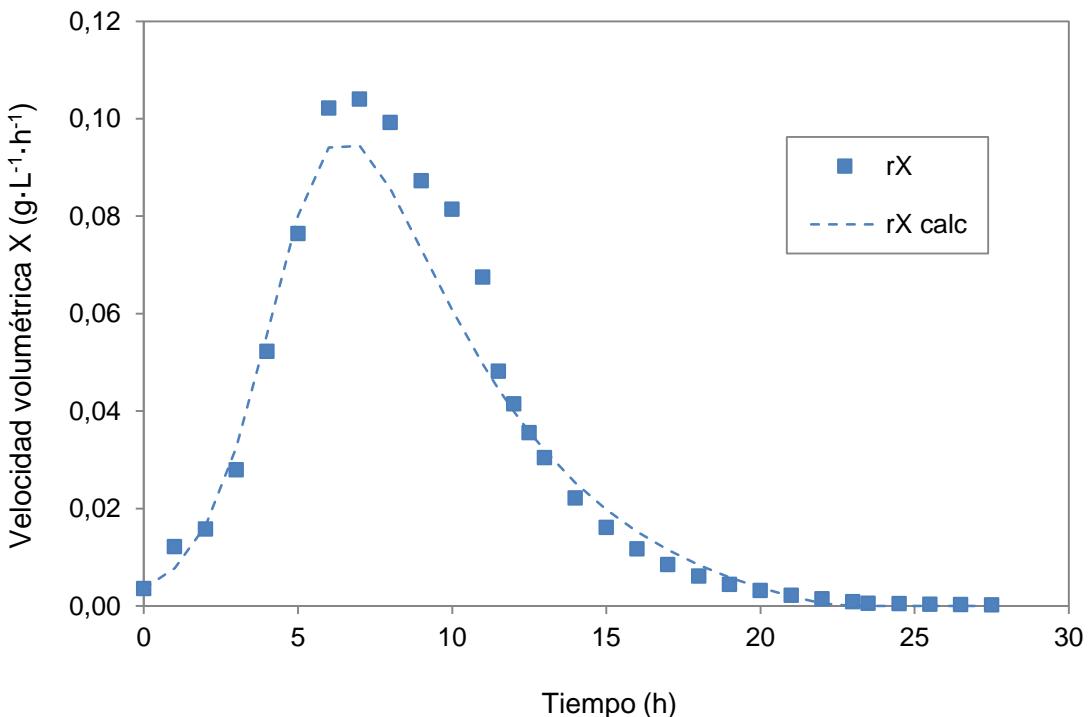


Figura 5.12. Ajuste de la velocidad volumétrica frente al tiempo a través del modelo de Tessier, a 30 °C.

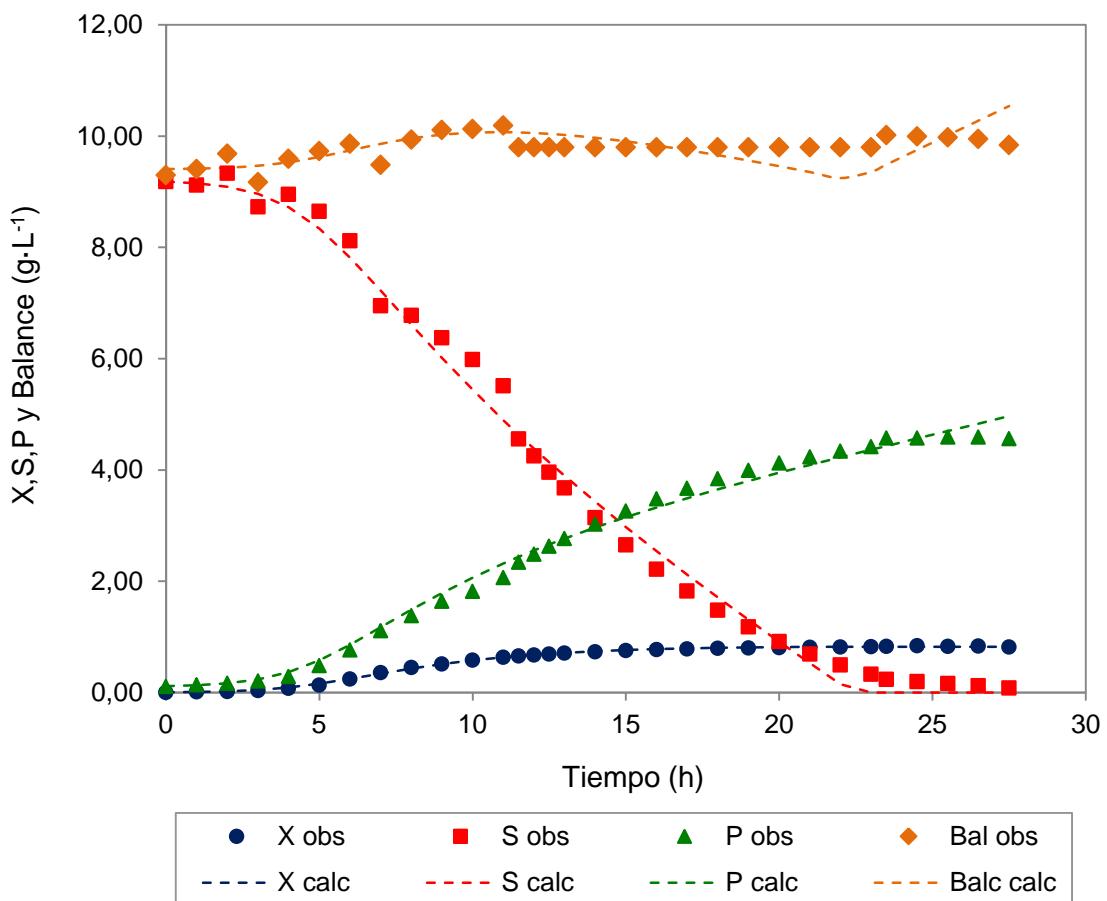


Figura 5.13. Ajuste de la concentración de biomasa, sustrato, producto y balance de materia a través del modelo de Tessier con inhibición Aiba, a 30 °C.

En la Figura 5.12 se observa como la velocidad volumétrica de biomasa (r_X) es pequeña al principio porque la concentración de biomasa (X) también lo es, conforme pasa el tiempo aumenta hasta alcanzar un valor máximo y, finalmente, cuando se va agotando el sustrato (S), disminuye hasta anularse. Este comportamiento observado para la cinética microbiana catalizada por la biomasa (X) es característico de la denominada autocatálisis, en comparación con otras reacciones en las que la velocidad se mantiene o va decreciendo continuamente.

En la Figura 5.13 se puede apreciar el buen cumplimiento del balance de materia a lo largo del tiempo de experimentación.

Una vez obtenidos, para los diferentes modelos utilizados, los valores de los parámetros cinéticos, se puede estimar el efecto de la temperatura y calcular las correspondientes energías de activación y factores pre-exponentiales involucrados en cada parámetro.

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos resultantes de los ajustes para 30 °C

	Monod + Aiba	Tessier 1 + Aiba	Tessier 2 + Aiba	Tessier 3 + Aiba	Konak + Aiba	Moser 1 + Aiba	Moser 2 + Aiba	Contois 1 + Aiba	Contois 2 + Aiba	Webb 1 + Aiba	Webb 2 + Aiba
$\mu_m (h^{-1})$	0,9519 ± 0,123	1,1285 ± 0,220	2,9207 ± 0,204	2,3057 ± 0,378	0,9492 ± 0,185	2,5670 ± 0,083	1,4961 ± 0,288	0,9086 ± 0,145	0,8940 ± 0,175	1,6283 ± 0,008	1,8074 ± 0,223
$K_s (g \cdot L^{-1})$	0,0271 ± 0,005	5,7623 ± 0,053	17,1503 ± 1,176	24,2857 ± 0,186	0,0015 ± 0,0002	18,2370 ± 1,871	5,6424 ± 0,151	5,0986 ± 0,676	4,2969 ± 0,380	9,3507 ± 0,176	10,6985 ± 1,631
n			0,8295 ± 0,135	0,8167 ± 0,113		0,9005 ± 0,171	1,0467 ± 0,115				
b					2,1958 ± 0,074						
$K_{is} (g \cdot L^{-1})$											93,1592 ± 15,587
β											1,2281 ± 0,076
$Y_{sx} (g \cdot g^{-1})$	4,9129 ± 0,927	4,9083 ± 0,667	4,8574 ± 0,467	4,8545 ± 0,148	4,5286 ± 0,347	4,8648 ± 0,858	4,8556 ± 0,807	4,6728 ± 0,039	4,8822 ± 0,421	4,9004 ± 0,420	4,8984 ± 0,505
$Y_{px} (g \cdot g^{-1})$	2,4102 ± 0,079	2,8283 ± 0,360	2,8115 ± 0,147	2,8092 ± 0,121	2,2660 ± 0,191	2,8114 ± 0,265	2,8060 ± 0,505	2,7633 ± 0,546	2,8095 ± 0,079	2,8312 ± 0,535	2,8333 ± 0,262
$m_s (h^{-1})$	0,5304 ± 0,034	0,4580 ± 0,004	0,4610 ± 0,040	0,4605 ± 0,071	0,5021 ± 0,047	0,4602 ± 0,059	0,4604 ± 0,024	0,4887 ± 0,074	0,4579 ± 0,077	0,4572 ± 0,062	0,4574 ± 0,061
p	1,2648 ± 0,239	1,0461 ± 0,015	1,0300 ± 0,044	1,0270 ± 0,111	1,0000 ± 0,115	1,0311 ± 0,182	1,0266 ± 0,093	1,0155 ± 0,004	1,0286 ± 0,079	1,0401 ± 0,108	1,0400 ± 0,045
$m_p (h^{-1})$	0,2146 ± 0,030	0,1653 ± 0,016	0,1668 ± 0,020	0,1667 ± 0,029	0,2077 ± 0,028	0,1666 ± 0,015	0,1674 ± 0,009	0,1691 ± 0,023	0,1668 ± 0,019	0,1652 ± 0,025	0,1654 ± 0,018
q	1,2036 ± 0,182	1,0551 ± 0,060	1,0564 ± 0,132	1,0520 ± 0,192	1,0000 ± 0,068	1,0533 ± 0,049	1,0582 ± 0,150	1,0342 ± 0,074	1,0534 ± 0,013	1,0568 ± 0,026	1,0621 ± 0,102
$K_p (g \cdot L^{-1})$	0,8329 ± 0,120	1,0990 ± 0,013	1,1586 ± 0,006	1,1550 ± 0,083	0,8292 ± 0,022	1,1310 ± 0,197	1,0728 ± 0,097	1,1720 ± 0,180	1,2693 ± 0,036	1,1342 ± 0,037	1,1444 ± 0,065
F.O. (CSM)	16,55227	16,49952	16,50899	16,51050	15,82936	16,49571	16,46224	16,40020	16,43014	16,50251	16,46049
$R^2 X$	0,99899	0,99897	0,99902	0,99902	0,99914	0,99900	0,99896	0,99889	0,99891	0,99897	0,99897
$R^2 S$	0,99347	0,99351	0,99346	0,99345	0,99314	0,99347	0,99349	0,99347	0,99352	0,99351	0,99350
$R^2 P$	0,99209	0,99160	0,99147	0,99147	0,98180	0,99151	0,99154	0,99143	0,99164	0,99160	0,99160

De esta manera se realizaron los ajustes monovariable y multivariable comentados en el apartado 4.7.2.

De entre todos los modelos testados, se han utilizado únicamente los de Monod, Tessier y Konak, por ser los que mejores resultados presentaban (ver Tabla 5.3). Se muestran únicamente los resultados para el modelo de Tessier por ajuste monovariable, por no alargar en exceso la extensión de este trabajo. En la Tabla 5.4 se muestran los parámetros cinéticos ajustados para el modelo de Tessier con inhibición Aiba, así como el valor resultado de maximizar la función objetivo global y sus coeficientes de ajuste al cuadrado. Se puede observar que sus coeficientes de ajuste son cercanos a la unidad para todas las temperaturas testeadas.

Tabla 5.4. Parámetros cinéticos resultantes del ajuste monovariable a través del modelo de Tessier-Aiba para varias temperaturas.

Parámetro cinético	Temperatura (°C)			
	20	25	30	35
$\mu_m (h^{-1})$	0,2820 ± 0,025	0,4719 ± 0,042	1,1279 ± 0,102	1,7339 ± 0,156
$K_s (g \cdot L^{-1})$	0,0509 ± 0,005	0,9570 ± 0,086	5,7558 ± 0,518	29,4124 ± 2,647
$Y_{xs} (g \cdot g^{-1})$	0,3157 ± 0,028	0,2972 ± 0,027	0,2037 ± 0,018	0,0882 ± 0,008
$Y_{xp} (g \cdot g^{-1})$	0,6174 ± 0,056	0,7220 ± 0,065	0,3536 ± 0,032	0,2386 ± 0,021
$m_s (h^{-1})$	0,4913 ± 0,044	0,4422 ± 0,040	0,4580 ± 0,041	0,4398 ± 0,035
p	1,2833 ± 0,115	0,6585 ± 0,059	1,0461 ± 0,094	0,0606 ± 0,005
$m_p (h^{-1})$	0,2100 ± 0,019	0,2330 ± 0,021	0,1653 ± 0,015	0,0109 ± 0,001
q	1,2495 ± 0,112	0,6874 ± 0,062	1,0551 ± 0,095	1,2118 ± 0,109
$K_p (g \cdot L^{-1})$	0,9771 ± 0,088	1,0054 ± 0,090	1,0990 ± 0,099	4,2827 ± 0,385
F.O. (CSM)	17,52372	19,32211	16,49950	16,91797
$R^2 X$	0,99593	0,99847	0,99897	0,91034
$R^2 S$	0,98969	0,99659	0,99351	0,99966
$R^2 P$	0,99952	0,99936	0,99161	0,99877
F.O.G (CSM _{global})	70,26331			

Se puede observar como la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) aumenta conforme lo hace la temperatura. Aunque en este trabajo no se ha observado

el efecto, la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) crece con la temperatura hasta un cierto punto en el que se inicia la desnaturización de las proteínas, y un rápido descenso más allá de esta temperatura (Ratledge et al., 2009). Para observar dicho fenómeno se tendría que haber experimentado con temperaturas superiores a los 35 °C.

Como es lógico, si la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_m) aumenta, por su propia definición, la constante de sustrato (K_S) también lo hará, como se puede comprobar según nuestros ajustes.

El rendimiento de biomasa a partir de sustrato (Y_{XS}) ajustado parece disminuir con el aumento de la temperatura. Esto indicaría que el sustrato consumido se desvía de la producción de biomasa conforme aumenta la temperatura. Por otro lado el rendimiento de biomasa a partir de producto (Y_{XP}) también parece disminuir con la temperatura, sobre todo a 35 °C.

La constante de inhibición por producto (K_P) permanece prácticamente constante para las tres primeras temperaturas, aumentando a 35 °C. Este resultado es sorprendente, ya que según la bibliografía, el efecto de la inhibición del crecimiento de la biomasa por efecto del etanol, es más acusado, al aumentar la temperatura de operación (Torija, 2002). Sin embargo, todos los resultados obtenidos en este trabajo indican que el valor de K_P se mantiene constante a temperatura por debajo de 30 °C. A 35 °C, incluso se observa un aumento de K_P , lo que implica una disminución del efecto de inhibición, pero este valor puede estar afectado por la competencia de otras reacciones metabólicas, que dan lugar a la síntesis de otros productos distintos del etanol (Casey & Ingledew, 1986). No obstante, este aspecto debe ser clarificado en estudios posteriores.

En la Tabla 5.5 se presentan los valores de la energía de activación de cada parámetro cinético, obtenidas mediante ajuste monovariable y multivariable, mediante el denominado modelo de Tessier-Aiba a través de la ecuación de Arrhenius.

Tabla 5.5. Energías de activación de cada parámetro cinético a través del ajuste monovariable y multivariable para Tessier-Aiba.

	μ_m	K_s	K_p	Y_{xs}	Y_{xp}
Ea monovariable (kJ·mol⁻¹)	$94,9 \pm 4,7$	$313,8 \pm 15,7$	$67,2 \pm 3,4$	$62,7 \pm 3,1$	$53,2 \pm 2,7$
Ea multivariable (kJ·mol⁻¹)	$70,4 \pm 3,5$	$241,9 \pm 12,1$	$4,0 \pm 0,2$	$32,7 \pm 1,6$	$33,4 \pm 1,7$

Los ajustes exponenciales realizados para calcular las energías de activación en el ajuste monovariable para cada parámetro a través de la ecuación (32) se muestran en las siguientes gráficas de Arrhenius:

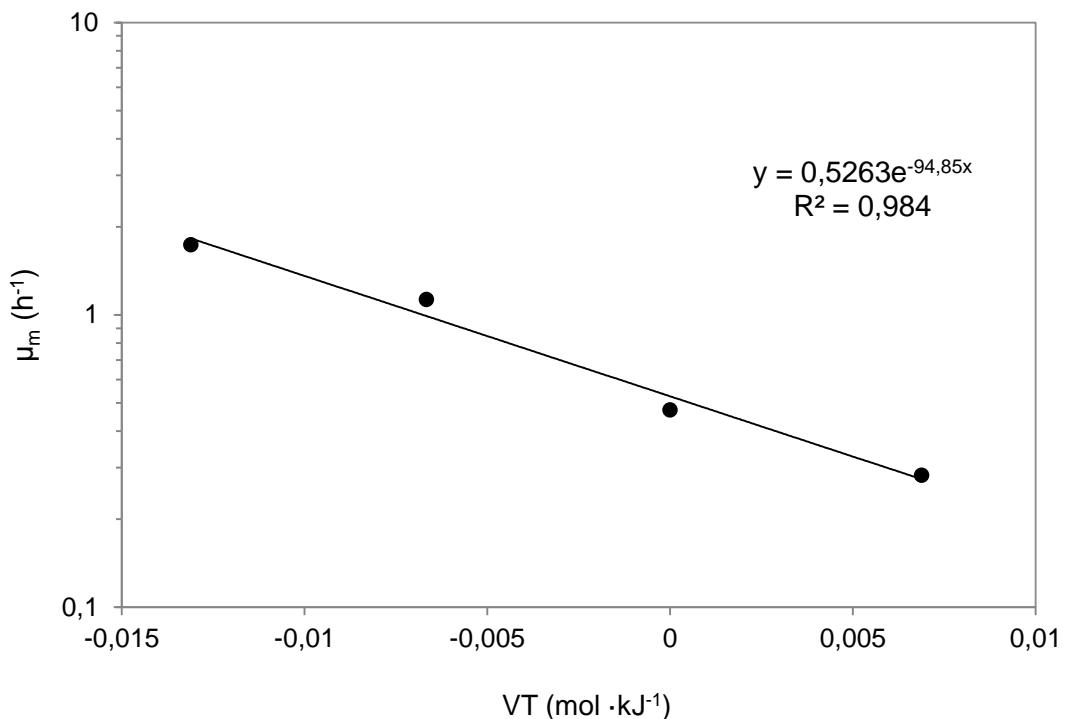


Figura 5.14. Representación de Arrhenius para la velocidad específica máxima de crecimiento.

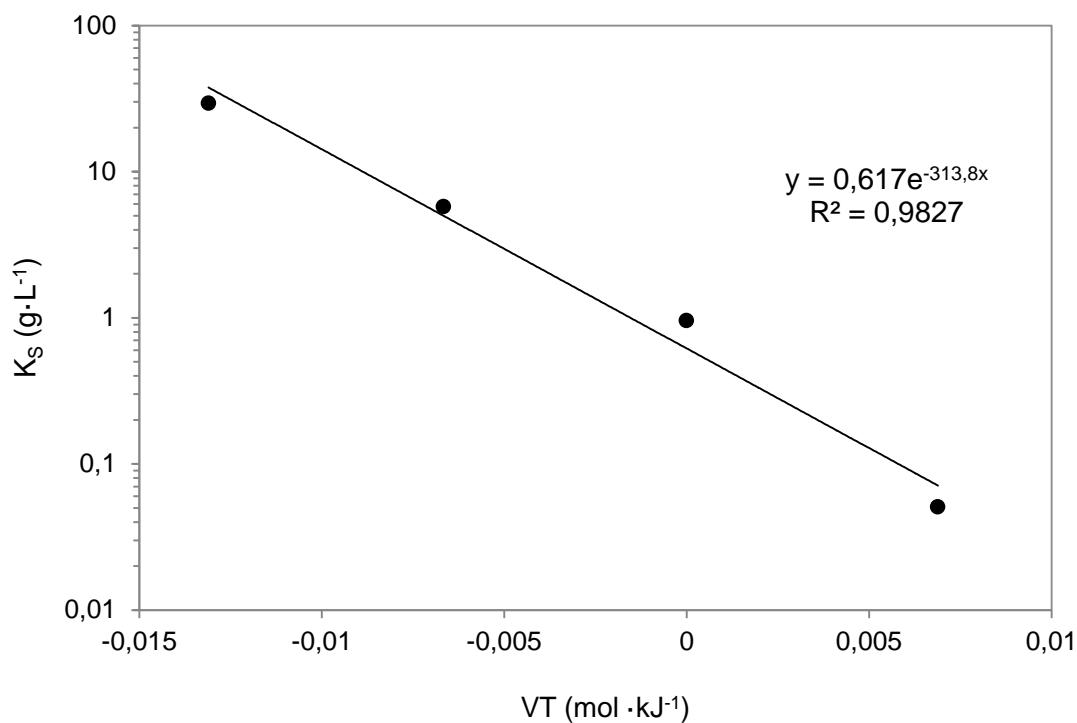


Figura 5.15. Representación de Arrhenius para la constante de sustrato.

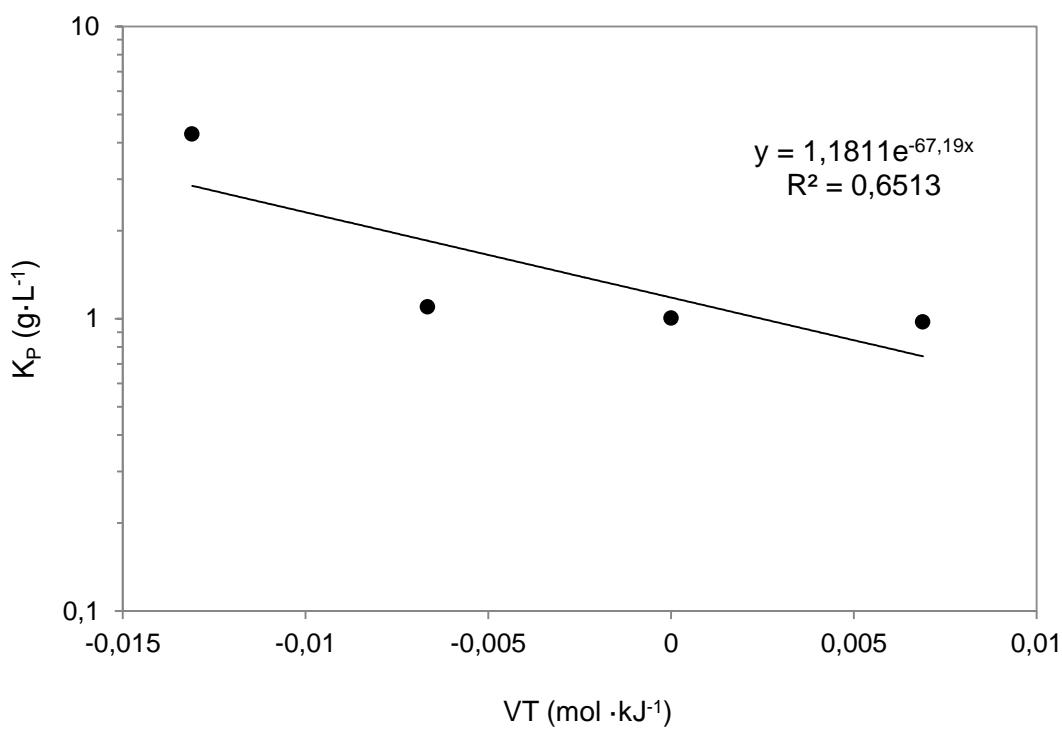


Figura 5.16. Representación de Arrhenius para la constante de producto.

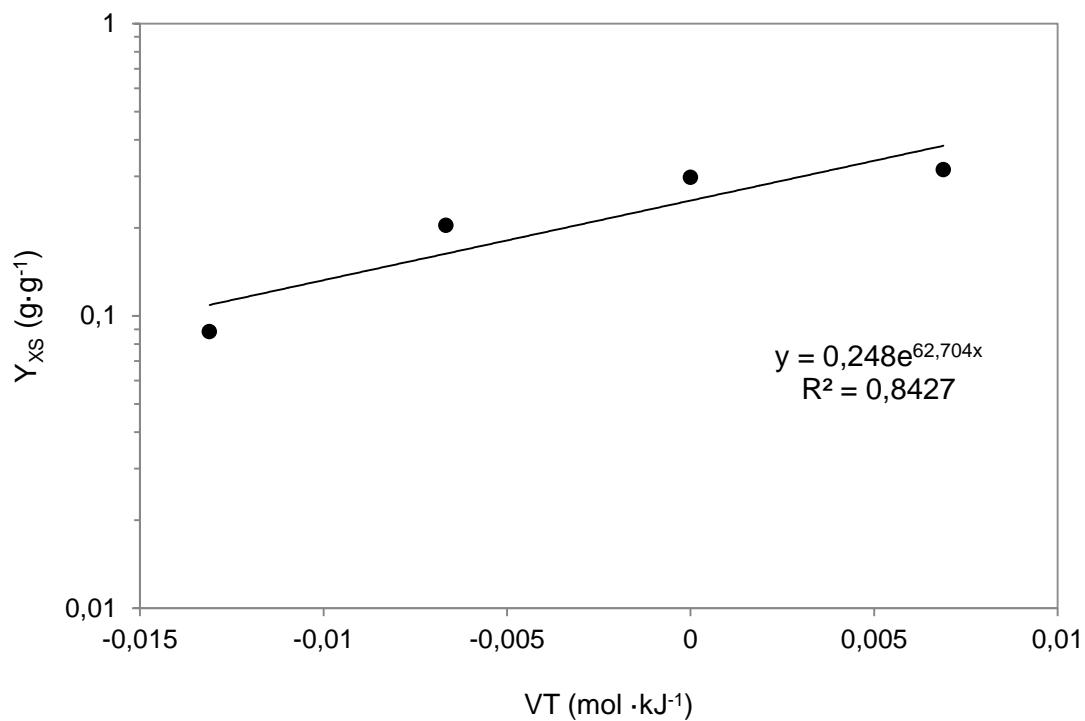


Figura 5.17. Representación de Arrhenius para el rendimiento de biomasa a partir de sustrato.

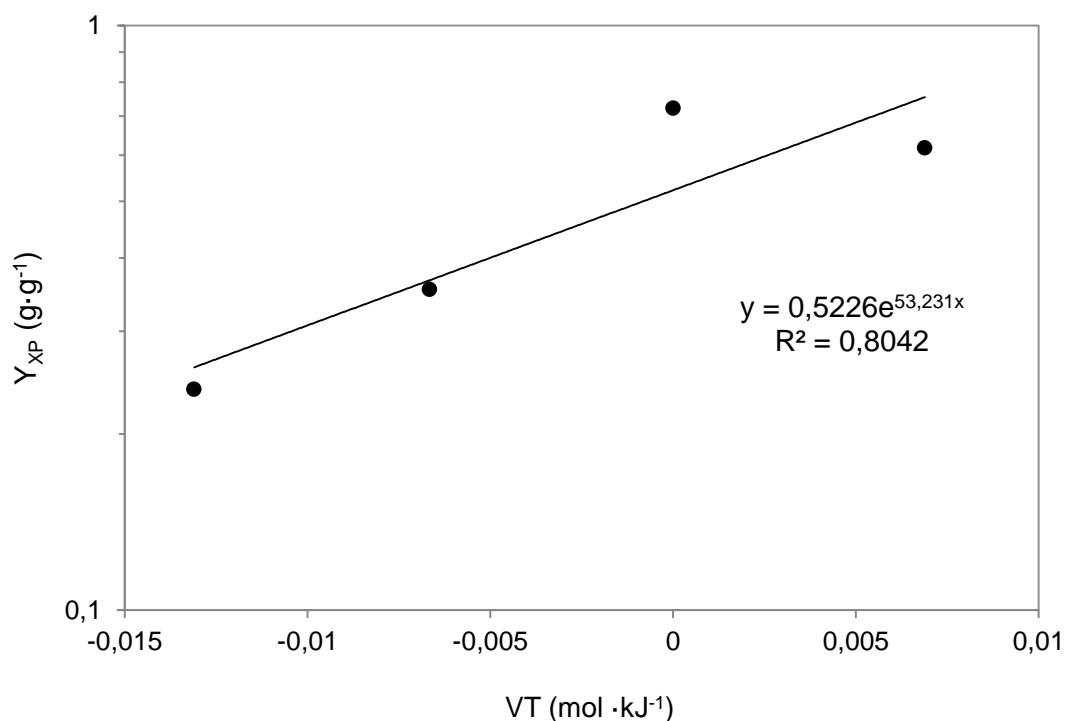


Figura 5.18. Representación de Arrhenius para el rendimiento de biomasa a partir de producto.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados, así como los posteriores ajustes experimentales de los datos observados, permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos elaborados para el seguimiento del bioprocreso así como las condiciones de trabajo empleadas, han conseguido una reproducibilidad en los experimentos muy significativa.
2. El ajuste experimental de los datos observados a través de los diferentes modelos cinéticos utilizados ha permitido obtener con suficiente precisión los parámetros cinéticos necesarios para la correcta modelización del bioprocreso, lo que permitiría el diseño de un posible biorreactor a escala industrial.
3. Se ha analizado el efecto de la temperatura mediante diversos modelos cinéticos, ver Tabla 5.3, de crecimiento de biomasa (SC) en condiciones anaerobias, de consumo de sustrato (glucosa) y de obtención de producto (etanol). Estos modelos incluyen los procesos de mantenimiento metabólico y el efecto de inhibición del producto. De todos los modelos ensayados, el denominado modelo de Tessier-Aiba es el que mejor ajusta los resultados experimentales.
4. Mediante el modelo de Tessier-Aiba se ha obtenido que la energía de activación aparente de proceso (correspondiente al parámetro μ_m) es de unos 70 kJ/mol. Así mismo, la energía de activación aparente asociada al parámetro K_S (análogo a la constante de Monod) es de unos 240 kJ/mol. Los rendimientos de sustrato a biomasa y producto disminuyen con la temperatura de operación.
5. La constante de inhibición por el producto (K_P) permanece constante para las temperaturas por debajo de 30 °C. A temperaturas superiores, se observa una disminución del efecto de inhibición (i.e. un aumento de K_P), lo cual puede ser debido a la competencia de otras reacciones metabólicas que dan lugar a la síntesis de otros productos distintos del etanol (Casey & Ingledew, 1986).
6. Las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato (glucosa) y formación de producto (etanol) de la cepa estudiada de *Saccharomyces*

cerevisiae, en condiciones anaerobias, no se ven alteradas frente a concentraciones de lindano en el medio de cultivo por debajo de 2000 ppb.

7. No existen evidencias claras de una posible metabolización del lindano por parte de la cepa estudiada de *Saccharomyces cerevisiae* para su uso como fuente de carbono y energía, bajo las condiciones empleadas.

Para la realización de trabajos futuros dentro de este ámbito se proponen los siguientes puntos:

1. Utilización de otra especie microbiana de la que exista constancia de su degradación del lindano, para el posible diseño de un biorreactor de eliminación de lindano en aguas contaminadas.
2. Independientemente de la utilización de otra especie microbiana, plantear un diseño experimental que permita estudiar otras variables del proceso como puede ser el pH, la concentración de sustrato, condiciones aerobias (oxígeno disuelto), la agitación etc., además de la temperatura.

Fuera del ámbito de estudio de este trabajo, ya que con la consecución del mismo se ha puesto en marcha una línea experimental para el estudio de un bioproceso, se deberían contemplar las siguientes posibilidades de estudio:

1. La utilización de distintos subproductos para su uso como medio de cultivo en un determinado bioproceso de interés industrial.
2. La producción de diversos metabolitos de interés comercial como enzimas, antibióticos, insecticidas, proteínas terapéuticas, ácidos orgánicos, pigmentos, vacunas, vitaminas etc., a través de cepas microbianas especializadas, o incluso de cepas modificadas genéticamente para su experimentación confinada.
3. La cinética enzimática de una determinada enzima en particular.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de preparación del preinóculo

Reactivos

- Levaduras secas activas (LSA).
- Agua destilada estéril.
- Medio de cultivo líquido preparado según apartado 4.1.2.
- Disoluciones ácido y base preparadas según apartado 4.3.2.

Material

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Imán de agitación magnética.
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Papel de aluminio.

Equipos

- Baño de agua.
- pH-metro.
- Cámara de cultivo.
- Autoclave.
- Balanza granataria.
- Agitador magnético y vórtex.
- Micropipetas.

Procedimiento

Preparación del matraz de cultivo

1. Añadir 250 mL de medio de cultivo líquido a un matraz Erlenmeyer (matraz de cultivo). Introducir el imán de agitación magnética.
2. Ajustar al pH elegido (apartado 4.3.1) con el pH-metro y las disoluciones ácido y base en agitación magnética.
3. Cubrir el cuello del Erlenmeyer con papel de aluminio y autoclavar a 121 °C durante 15 min.

Rehidratación de LSA e inoculación del matraz de cultivo

1. Pesar 0,1 g de levadura seca activa (LSA) en la balanza granataria e introducirlos en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. De esta manera la concentración de LSA en el matraz de cultivo será 0,4 g/L que es lo que recomienda el fabricante.
2. Calentar al baño maría un frasco con agua destilada estéril a 35 °C. Cuando alcance la temperatura, pipetear 1 mL al tubo Eppendorf con las levaduras. Agitar en el vórtex hasta su disolución y colocar en el baño maría a 35 °C durante 20 minutos. De esta forma, las levaduras se rehidratan en 10 veces su peso en agua destilada estéril como recomienda el fabricante.
3. Para la inoculación del matraz de cultivo, retirar con cuidado el papel de aluminio que lo cubre y pipetear todo el contenido del tubo Eppendorf. Volver a cubrir. Colocar en la cámara de cultivo para su incubación con agitación media en las condiciones que se indican en el apartado 4.3.1.

Anexo 2. Protocolo de toma de muestras

Reactivos

- Formaldehído al 37-38 % estabilizado con metanol (formol)

Material

- Viales de recogida de muestras de 20 mL.
- Viales de cromatografía de 1,5 mL.
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Tubos Falcon de 15 mL.
- Pipeta Pasteur.

Equipos

- Centrífuga de tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Centrífuga de tubos Falcon de 15 mL.
- Micropipeta de 1000 μ L.
- Vortex.

Procedimiento

A través del sistema de toma de muestras directo del biorreactor se extraen en un vial de recogida de muestras 10 mL aproximadamente del caldo de cultivo, para repartir como describen los siguientes pasos:

1. Pipetear 450 μ L de muestra a un tubo Eppendorf junto con 50 μ L de formaldehído al 37 %. Agitar en el vortex. Este tubo Eppendorf, rotulado adecuadamente, se reserva para la determinación total de microorganismos. De esta manera se fijan las células al 3,7 % en formol.
2. Pipetear a dos tubos Eppendorf, 1500 μ L de muestra en cada uno y centrifugar a 12000 rpm durante 6 minutos para separar las células. Posteriormente pipetear 1000 μ L del sobrenadante de cada uno y transferir a un tubo Eppendorf y a un vial de 1,5 mL de cromatografía, que se reservan para el análisis de la glucosa y del etanol respectivamente.
3. El resto del volumen del vial de recogida de muestras se utiliza para la medición de la absorbancia con el espectrofotómetro VIS según se detalla en el apartado. Se recomienda realizar la medición mientras se centrifugan los tubos Eppendorf del paso anterior.

Anexo 3. Protocolo de determinación del número total de microorganismos

Reactivos

No se describen reactivos en este protocolo.

Materiales

No se describen materiales en este protocolo.

Equipos

- Microscopio Optika modelo B-350.
- Cámara de conteo celular tipo Bürker.
- Software: Optika 7.1 e ImageJ 1.50b.
- Micropipeta de 10 μ L.
- Vórtex.

Procedimiento

Captura de imágenes al microscopio

1. Cargar la cámara de conteo Bürker con una muestra recogida para la determinación total de microorganismos (ver apartado 4.3.5). Para ello pipetear 10 μ L de muestra y e ir introduciéndolos lentamente entre el cubreobjetos y el portaobjetos de la cámara Bürker. Observar que el líquido se desplaza llenando el espacio que existe entre el cubreobjetos y el portaobjetos. Cuando dicho espacio se ha llenado completamente es el momento de dejar de pipetear.
2. Una vez cargada la cámara Bürker se coloca en el microscopio. Enfocar con el objetivo de 10x hasta obtener una imagen nítida. Conectar la cámara digital del microscopio al ordenador y ejecutar el software OptikaView 7.1. El software detecta automáticamente la cámara. Seleccionar cámara a color. Se abre una nueva ventana con la imagen en directo que recoge del microscopio. Enfocamos de nuevo si es necesario y pulsamos “Snap” para hacer una captura.
3. Capturar 5 fotos aleatorias fuera de la cuadrícula de conteo, y guardarlas en una carpeta para cada muestra. Esto último es importante para la correcta actuación de la macro de conteo automático del siguiente apartado. En la barra de título de la ventana de captura aparece el directorio donde se guardan las fotos. Se recomienda tomar las cuatro primeras fotos en cada esquina de la

cuadrícula y la quinta donde se deseé. De esta manera conseguimos que la captura de imágenes sea lo más representativa posible.

4. Repetir los pasos 1, 2 y 3 con cada muestra que recojamos del biorreactor.

Procesamiento de las imágenes y conteo

1. Para el conteo celular de las fotos capturadas para cada muestra y que hemos organizado en carpetas utilizamos la macro de conteo “CellCounting_modificada” que previamente hemos instalado. Ver siguiente apartado. Ejecutar el software ImageJ. Pulsar “Plugins” y en el desplegable seleccionar la macro de conteo “CellCounting_modificada”. Se abre una ventana para que seleccionemos la carpeta donde están guardadas las 5 fotos capturadas para cada muestra. Pulsar “Select” y automáticamente el programa realiza el conteo y genera un documento de texto que guarda en la misma carpeta donde se encuentran las fotos. En dicho documento aparece el número de células que ha contado en cada foto, la media, la desviación estándar y el valor máximo y mínimo.
2. Para hallar el área real que se observa en las fotografías realizadas debemos capturar una imagen de la cuadrícula de la cámara de conteo. El objetivo es obtener una captura en la que aparezca una dimensión conocida para que el software ImageJ calcule el área real. Ejecutar ImageJ y abrir dicha imagen. Con la herramienta de trazado de líneas, trazar un segmento sobre la arista de un cuadrado de 0,2 mm. (ver Figura A 1) Pulsar “Analyze/Set scale...” y en “Know distance” introducir 0.2 (utilizar el punto decimal) y en “Unit of lenght” escribir mm. Pulsar “Ok”. Automáticamente en la barra de estado de la imagen aparecen las dimensiones del área que vemos en la imagen en mm. El paso 2 no hay que realizarlo con cada foto, ya que si no modificamos las condiciones de la captura, el área real se mantiene constante entre fotografías.
3. Finalmente en una hoja Excel implementamos la siguiente relación para calcular el número de células por unidad de volumen de una muestra. En ocasiones el número de células será muy elevado y será necesario realizar una dilución para un conteo adecuado:

$$\text{Células por unidad de vol.} = \frac{\text{Media del número de células}}{\text{Área foto} \cdot \text{Altura cámara}} \cdot \text{Factor dilución}$$

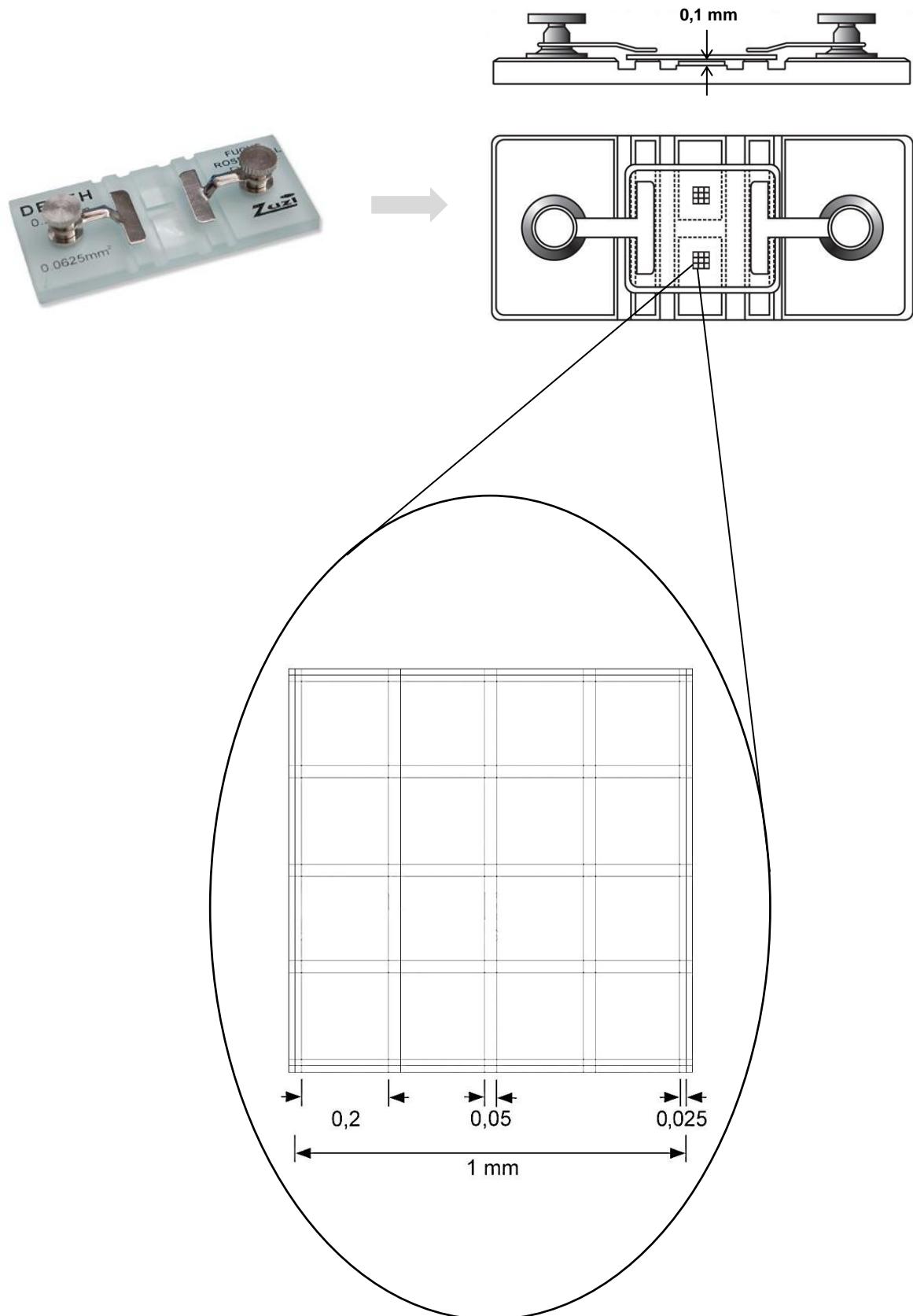


Figura A 1. Esquema cámara Bürker y dimensiones de cuadrícula de un cuadrado grande (fuente: elaboración propia a partir de catálogo comercial Celeromics)

Macro de conteo automática

La macro de conteo modificada a partir de la macro creada por por Ivan V. Grishagin de la Universidad de California (Grishagin, 2015) se muestra a continuación.

Para su instalación únicamente hay que copiar el código en un procesador de texto plano (Bloc de notas en Windows) y salvarlo con la extensión “.ijm”. Posteriormente este archivo se copiará en la carpeta “Plugins” del software ImageJ.

Macro CellCounting_modificada

```
macro "cell_count--Maxima" {

    //show prompt for selection of source directory
    dir = getDirectory("Choose source directory");
    list = getFileList(dir);    //get the file list
    resultsFileName = "Cell counting results (ccm1).txt"

    setBatchMode(true);    //hide all the details from user
    //process every file...
    for (i=0; i<list.length; i++) {

        //...that has .bmp extension
        if (endsWith(list[i], ".bmp")) {
            open(dir+list[i]);

            //find intensity maxima
            run("Find Maxima...", "noise=10 output=[Count] exclude light");
            selectWindow(list[i]);
            close();
        }
    }
    //summarize all data and copy the results
    run("Summarize");
    String.copyResults();
    setBatchMode(false);

    //create a text file with counting results
    saveAs("Results", dir+resultsFileName);
}
```

Anexo 4. Protocolo de determinación del peso seco celular

Reactivos

- Agua destilada

Materiales

- Viales de recogida de muestras de 20 mL.
- Viales de vidrio de 20 mL con tapa.
- Tubos Falcon de 15 mL.
- Pipeta Pasteur.

Equipos

- Centrífuga para tubos tipo Falcon de 15 mL refrigerada.
- Estufa.
- Micropipeta de 1000 µL.
- Balanza analítica.
- Vórtex.

Procedimiento

Tarado de viales

1. Pesar en la balanza analítica 6 viales de vidrio de 20 mL sin tapa y anotar sus pesos exactos. Los viales deben estar perfectamente limpios y sin restos de ningún tipo. Se recomienda trabajar con guantes para no dejar huellas en los viales que modifiquen el peso.
2. Rotular las tapas de los viales con el fin de identificar cada vial con su peso exacto.

Secado de la muestra

1. A partir de la toma de muestras directa del biorreactor recoger 15 mL aproximadamente de caldo de cultivo en los viales de recogida de muestras de 20 mL.
2. Transvasar 14 mL a un tubo Falcon de 15 mL y centrifugar la muestra en la centrifuga para tubos tipo Falcon a 5000 rpm durante 12 minutos a 4°C.
3. Pasado ese tiempo, con ayuda de una pipeta Pasteur eliminar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar parte del pellet.

4. Añadir aproximadamente 10 mL de agua destilada y agitar en el vórtex hasta que el pellet se haya resuspendido completamente.
5. Centrifugar a 5000 rpm durante 12 minutos a 4 °C.
6. Pasado ese tiempo, eliminar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar parte del pellet.
7. Añadir una pequeña cantidad de agua destilada (aproximadamente 1000 µL) suficiente para resuspender el pellet de nuevo con ayuda de la micropipeta de 1000 µL.
8. Pipetear todo el contenido del tubo Falcon a uno de los viales tarados previamente e introducirlo en la estufa a 105 °C durante 24 horas sin la tapa (Rice et al., 1980).

Cálculo del peso seco celular

1. Transcurrido el tiempo de secado sacar los viales de la estufa y taparlos con sus correspondientes tapas.
2. Quitar la tapa y pesarlos en la balanza analítica hasta que la medida del peso se estabilice. Se recomienda trabajar con guantes.
3. El cálculo del peso seco celular se calcula con la siguiente ecuación donde el volumen de caldo de cultivo serán los 14 mL centrifugados inicialmente:

$$\text{Peso seco celular} = \frac{\text{Peso vial tras secado} - \text{Peso tara vial}}{\text{Volumen de caldo de cultivo}}$$

Anexo 5. Protocolo de análisis de glucosa

Reactivos

- Ácido sulfúrico 95-98 % puro.
- Disolución de fenol en agua destilada al 80 % p/p.
- Disolución madre de D(+)-glucosa de 100 mg/L.
- Agua destilada.

Materiales

- Tubos de ensayo de 25 mL (20 uds.) y gradilla metálica.
- Vasos de precipitado de 500 mL y 100 mL.

Equipos

- Espectrofotómetro para el espectro visible.
- Micropipetas de 100, 1000 y 5000 μ L.
- Vórtex.
- Baño de agua.
- Dispensador de 10 mL para ácidos.

Procedimiento

Recta de calibrado

Se recomienda preparar 5 patrones de glucosa a partir de una disolución madre de glucosa de 100 mg/L en tubos de ensayo a un volumen final de 2 mL con agua destilada a la concentración que se muestra en la Tabla A 1. Preparar un blanco.

Tabla A 1. Concentración de los patrones y volúmenes para su preparación

Concentración glucosa (μ g/mL)	Disolución madre (mL)	Agua destilada (mL)
0	0,0	2,0
10	0,2	1,8
20	0,4	1,6
30	0,6	1,4
40	0,8	1,2
50	1,0	1,0

Una vez preparadas las disoluciones patrón en cada tubo de ensayo se procede siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. Añadir 50 µL de disolución de fenol en agua al 80 % p/p a cada uno de los tubos de ensayo que contienen un volumen total de 2 mL. Agitar con vórtex.
2. Añadir 5 mL de ácido sulfúrico 95-98 % puro a cada uno de los tubos con el dispensador. Se ha de añadir rápidamente al tubo de ensayo dirigiendo el chorro contra la superficie del líquido a efecto de conseguir un buen mezclado (El calor generado impulsa la reacción por ello se debe normalizar la velocidad de adicción del ácido). Agitar con vórtex.
3. Dejar reposar los tubos durante 10 minutos. Colocarlos seguidamente en un baño de agua a 25 °C de 10 a 20 minutos (esto es para enfriarlos).
4. Agitar con vórtex antes de la lectura de la absorbancia. Para la lectura de la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro primero establecer el cero instrumental con la disolución blanco. Seguidamente medir los patrones del más diluido al más concentrado.

Análisis de muestras

1. Descongelar las muestras recogidas para la determinación de sustrato (ver apartado 4.3.5). Agitar en el vórtex.
2. En tubos de ensayo preparar en un volumen total de 4 mL en cada uno, las diluciones adecuadas con agua destilada para medir las muestras dentro del intervalo de la recta de calibrado calculada en el apartado anterior. Preparar un blanco (4 mL de agua destilada).
3. Añadir 100 µL de disolución de fenol en agua al 80 % p/p a cada uno de los tubos de ensayo que contienen un volumen total de 4 mL. Agitar con vórtex.
4. Añadir 10 mL de ácido sulfúrico 95-98 % puro a cada uno de los tubos con el dispensador. Se ha de añadir rápidamente al tubo de ensayo dirigiendo el chorro contra la superficie del líquido a efecto de conseguir un buen mezclado (El calor generado impulsa la reacción por ello se debe normalizar la velocidad de adicción del ácido). Agitar con vórtex.
5. Dejar reposar los tubos durante 10 minutos. Colocarlos seguidamente en un baño de agua a 25 °C de 10 a 20 minutos (esto es para enfriarlos).

6. Agitar con vórtex antes de la lectura de la absorbancia. Para la lectura de la absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro primero establecer el cero instrumental con la disolución blanco. Seguidamente medir las muestras de la más diluida a la más concentrada (esto es, empezando por la última muestra que se recogió en el biorreactor).

En el paso 2 se recomienda hacer las diluciones suponiendo en todas 10 g/L de glucosa para una concentración en la recta de calibrado de 50 μ g/mL (extremo superior), hasta que en las últimas muestras recogidas (glucosa prácticamente consumida) la señal obtenida se salga del intervalo de medición de la recta de calibrado, por lo que habrá que hacer diluciones suponiendo una concentración menor de glucosa.

Anexo 6. Protocolo de análisis de etanol

Reactivos

- Etanol al 96 % v/v.
- Agua destilada.

Materiales

- Viales de cromatografía de 1,5 mL.
- Dos matraces aforados de 100 mL.

Equipos

- Cromatógrafo de gases inyección automática (detector FID).
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L..

Procedimiento

Recta de calibrado

Se recomienda preparar 6 patrones de etanol a partir de dos disoluciones al 0,192 % y al 0,960 % de etanol en volumen con agua destilada. Para la preparación de las disoluciones se añaden 200 y 1000 μ L de etanol al 96 % v/v respectivamente en matraz aforado de 100 mL con agua destilada.

Los volúmenes a añadir para la elaboración de los patrones a un volumen final de 1,5 mL en viales cromatográficos, así como la concentración resultante de los mismos a partir de las disoluciones comentadas se muestran en la Tabla A 2.

Tabla A 2. Concentración de patrones y volúmenes para su preparación

Concentración disolución (%)	Disolución (μ L)	Agua destilada (μ L)	Concentración final etanol patrón (%) v/v
0,192	75	1425	0,0096
0,960	75	1425	0,0480
0,960	155	1345	0,0992
0,960	470	1030	0,3008
0,960	780	720	0,4992
0,960	1250	250	0,8000

Medición de patrones y muestras

Una vez preparados los patrones en los viales y recogidas las muestras para la determinación del etanol (ver apartado 4.3.5) se procede a su medición en el cromatógrafo. Para ello se siguen los siguientes pasos generales:

1. Colocar las muestras y los patrones en el carro automuestreador, además de los 2 viales de lavado de la jeringa (con agua destilada) y el vial de residuos.
2. Abrir los gases. En concreto helio, nitrógeno, aire e hidrógeno.
3. Encender el cromatógrafo y el ordenador asociado.
4. Ejecutar el software de Agilent (online).
5. Una vez dentro del programa, cargar el método (elaborado previamente) y crear una tabla de secuencia. En el método se especifican algunas de las condiciones cromatográficas indicadas en la Tabla 4.1 y Tabla 4.2. En la tabla de secuencia se relacionan las muestras colocadas en el carro automuestreador con su denominación y se indica el número de réplicas por cada vial.
6. Para comenzar los pinchazos pulsar “Run Sequence”.
7. Para ver los resultados una vez terminados los pinchazos ejecutar el software Agilent (Offline). El etanol aparece a un tiempo de retención de 1,8 minutos aproximadamente.

Para más detalles del proceso seguido acudir a los manuales del software y del equipo.

Anexo 7. Protocolo de análisis de lindano

Reactivos

- Lindano (γ -HCH)
- n-Hexano 95% para análisis de pesticidas.
- Sulfato sódico anhidro.
- Cloruro de sodio.
- Acetona.

Materiales

- Dos embudos de decantación de 50 mL.
- Soporte de laboratorio y dos pinzas.
- Viales de cromatografía de 1,5 mL.
- Dos tubos de ensayo herméticos de 20 mL.
- Vial de vidrio con tapa de 20 mL.

Equipos

- Cromatógrafo de gases inyección manual (detector ECD).
- Centrífuga para tubos tipo Falcon de 15 mL refrigerada.
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L.
- Balanza analítica.

Procedimiento

Recta de calibrado

Se recomienda preparar 5 patrones de lindano en hexano a partir de una disolución madre intermedia de 1 ppm de lindano en hexano. A su vez, dicha disolución madre intermedia se preparará a partir de una disolución madre de 1000 ppm de lindano en hexano. Se utiliza una disolución intermedia ya que hay que pesar muy poca cantidad de lindano para su preparación en un volumen final de 20 mL (capacidad máxima del tubo de ensayo hermético donde se conservarán las disoluciones madre).

La concentración teórica aproximada de los patrones y los volúmenes a añadir para su elaboración a partir de la disolución de 1 ppm de lindano en hexano en viales cromatográficos de 1,5 mL, se muestra en la Tabla A 3.

Tanto las disoluciones madre como los patrones se prepararán en peso, para conseguir más exactitud. Por ello se recalcularán las concentraciones reales de las disoluciones madre y de los patrones a partir del peso de los volúmenes añadidos.

Tabla A 3. Concentración de patrones y volúmenes para su preparación

Patrón teórico aproximado (ppb)	Disolución madre 1 ppm (μL)	Hexano (μL)
50	75	1425
125	190	1310
200	305	1195
275	420	1080
350	535	965

Los pasos a seguir para la preparación de un patrón se muestran a continuación:

1. Pesar un vial cromatográfico de 1,5 mL con su tapa en la balanza analítica y anotar su peso exacto.
2. Añadir el volumen de disolución madre de 1 ppm correspondiente al patrón teórico que se desee preparar (ver Tabla A 3). Cerrar rápidamente y pesar en la balanza analítica anotando el peso exacto.
3. Añadir el volumen de hexano correspondiente al patrón teórico que se desee preparar (ver Tabla A 3). Cerrar rápidamente y pesar en la balanza analítica anotando el peso exacto. Agitar con cuidado.
4. Colocar el vial en el congelador a -18 °C hasta su uso.

Debido a la gran volatilidad del hexano se recomienda trabajar rápidamente cerrando herméticamente las disoluciones lo antes posible y guardar en el congelador a -18 °C.

Toma de muestras

1. A partir de la toma de muestras directa del biorreactor recoger 15 mL aproximadamente de caldo de cultivo en los viales de recogida de muestras de 20 mL.
2. Transvasar 14 mL a un tubo Falcon de 15 mL y centrifugar la muestra en la centrifuga para tubos tipo Falcon a 5000 rpm durante 12 minutos a 4°C.
3. Pasado ese tiempo, con ayuda de una pipeta Pasteur transvasar el sobrenadante con cuidado de no arrastrar parte del pellet a otro tubo Falcon de 15 mL nuevo.

4. Conservar el tubo Falcon con el sobrenadante en el congelador a -18 °C hasta su análisis.

Extracción líquido-líquido

Se va a proceder a la extracción del lindano con hexano en dos fases en las muestras acuosas recogidas en el biorreactor (apartado anterior). Se siguen los siguientes pasos:

1. Pipetear 10 mL de muestra con pipeta aforada en un embudo de decantación de 50 mL.
2. Añadir una pequeña cantidad de cloruro de sodio con espátula.
3. Pipetear 5 mL de hexano. Cerrar el embudo de decantación y agitar vigorosamente durante 5 minutos invirtiendo de vez en cuando el embudo y abriendo la llave muy lentamente para dejar salir los gases.
4. Dejar reposar el embudo en el soporte durante 15 minutos aproximadamente hasta que las dos fases se separen claramente.
5. Pesar un vial de vidrio con tapa de 20 mL. Anotar el peso exacto.
6. Colocar en el soporte un segundo embudo de decantación debajo del primer embudo. Transvasar del primero al segundo la fase acuosa quitando el tapón y abriendo la llave lentamente.
7. Pipetear la fase orgánica al vial de vidrio pesado en el paso 5 con micropipeta y cerrar herméticamente.
8. Pipetear 5 mL de hexano de nuevo en el primer embudo. Cerrar el embudo de decantación y agitar ligeramente. Transvasar el hexano al segundo embudo de decantación. Cerrarlo y agitar vigorosamente durante 5 minutos invirtiendo de vez en cuando el embudo y abriendo la llave muy lentamente para dejar salir los gases.
9. Dejar reposar el embudo en el soporte durante 15 minutos aproximadamente hasta que las dos fases se separen claramente.
10. Desechar definitivamente la fase acuosa y recuperar con micropipeta la fase orgánica que se llevará al vial del paso 7.
11. Pesar el vial con tapa anotando el peso exacto tras las dos extracciones.

12. Añadir una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro y agitar. Pipetear 1500 μL con cuidado de no arrastrar partículas sólidas a un vial cromatográfico de 1,5 mL que se reserva a -18 °C hasta su análisis.

Se limpiarán los embudos de extracción con acetona para su uso con las siguientes muestras.

Análisis de lindano

Una vez preparados los patrones en los viales y realizadas las extracciones de las muestras de un experimento se procede a su medición en el cromatógrafo. Para ello se siguen los siguientes pasos generales:

1. Abrir el nitrógeno.
2. Encender el cromatógrafo y el ordenador asociado. Esperar a que se estabilice el cromatógrafo.
3. Pinchar 1 μL por el método de sándwich de la muestra extraída en el apartado anterior y pulsar “Start” en el cromatógrafo y “Ok” en el software de registro de datos rápidamente tras el pinchazo. Limpiar la microjeringa con hexano entre pinchazos.
4. Integrar el pico que se obtenga a un tiempo de retención de 7,5 minutos aproximadamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, S., Shoda, M., & Nagatani, M. (2000). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000320\)67:6<671::AID-BIT6>3.0.CO;2-W](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<671::AID-BIT6>3.0.CO;2-W)
- Alan, S. (1999). *Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. México: Editorial Limusa Noriega Editores, 1999.
- Alcón Martín, A. (1999). *Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano*. Universidad Complutense de Madrid.
- Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., & Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 233–239.
- Biggar, J. W., & Riggs, R. L. (1974). Apparent solubility of organochlorine insecticides in water at various temperatures. *Hilgardia*, 42(10), 383–391.
- Billo, E. J. (2011). *Excel for chemists : a comprehensive guide*. New York [etc.] : Wiley-VCH, 2011.
- Boyle, A. W., Häggblom, M. M., & Young, L. Y. (1999). Dehalogenation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(4), 379–387.
- Calvelo Pereira, R. (2008). *Estudio del comportamiento del hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta para su aplicación en técnicas de fitocorrección*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Casas Alvero, C., Gòdia Casablancas, F., & López Santín, J. (1998). *Ingeniería bioquímica*. Madrid : Síntesis, D.L. 1998.
- Casey, G. P., & Ingledew, W. M. M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219–280.

- CSIC. (2011). Seres modélicos: Entre la naturaleza y el laboratorio. Retrieved June 4, 2016, from <http://www.seresmodelicos.csic.es/>
- De Martín Barry, A. M. (2005). *Control del metabolismo de Saccharomyces cerevisiae en la síntesis de glutatión*. Universidad de Granada.
- Díaz, M. (2012). *Ingeniería de bioprocesos*. Madrid : Paraninfo, cop. 2012.
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza : Acribia, D.L. 1998.
- Dubois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Freeman, S. (2009). *Biología*. Madrid : Pearson Educación, 2009.
- Garre García, E. (2008). *Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa*. Universidad de Valencia.
- Govindaswamy, S., & Vane, L. M. (2007). Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technology*, 98(3), 677–685.
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.012>
- Grishagin, I. V. (2015). Automatic cell counting with ImageJ. *Analytical Biochemistry*, 473, 63–65. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.007>
- Gupta, A., Kaushik, C. P., & Kaushik, A. (2000). Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; α , β , γ and δ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11), 1803–1805.
- Harris, D. C. (2001). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona [etc] : Reverté, D.L. 2001.
- lagua. (2016). Los niveles de lindano en el río Gállego, por debajo del nivel de

- detección. Retrieved from <http://www.iagua.es/noticias/espana/gobierno-aragon/16/02/19/niveles-lindano-rio-gallego-debajo-nivel-deteccion>
- Jagnow, G., Haider, K., & Ellwardt, P.-C. (1977). Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*, 115(3), 285–292.
- Manickam, N., Misra, R., & Mayilraj, S. (2007). A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1468–1478.
- Melicias Pita, T. A. (2014). *Lindano: efeito sobre o crescimento, metabolismo energético e resposta antioxidante de *Saccharomyces cerevisiae* em distintos meios de cultura*. Universidad de Évora.
- Mertens, B., Boon, N., & Verstraete, W. (2006). Slow-release inoculation allows sustained biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 622–627.
- Mojović, L., Nikolić, S., Rakin, M., & Vukasinović, M. (2006). Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. *Fuel*, 85(12-13), 1750–1755.
- Nagata, Y., Endo, R., Ito, M., Ohtsubo, Y., & Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 741–752.
- Najafpour, G. D. (2007). *Biochemical engineering and biotechnology*. Amsterdam ; Boston : Elsevier, 2007.
- Nielsen, S. S. (2007). *Análisis de los alimentos : manual de laboratorio*. Zaragoza : Acribia , D. L. 2007.
- Nielsen, S. S. (2009). *Análisis de los alimentos*. Zaragoza : Acribia, 2009.
- Obom, K. M., Magno, A., & Cummings, P. J. (2013). Operation of a benchtop bioreactor. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (September).

- Pardo, I. (2003). Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *Ace: Revista de Enología*, 36.
- Pita, T., Alves-Pereira, I., & Ferreira, R. M. A. (2014). Lindane disturbs the capacity of *Saccharomyces cerevisiae* to scavenge lipid hydroperoxides via phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase causing cell death. *FEBS JOURNAL*.
- Ratledge, C., Kristiansen, B., & Liras Padín, P. (2009). *Biotecnología básica*. Zaragoza : Acribia, 2015.
- Rice, J. F., Sullivan, T. R., & Helbert, J. R. (1980). A rapid method for the determination of yeast dry weight concentration. *American Society of Brewing Chemists*, 38(4), 142–145.
- Richardson, L. T., & Miller, D. M. (1960). Fungitoxicity of chlorinated hydrocarbon insecticides in relation to water solubility and vapor pressure. *Canadian Journal of Botany*, 38(2), 163–175.
- Roels, J. A., & Kossen, N. W. F. (1978). On the modelling of microbial metabolism. *Prog. Ind. Microbiol.*, 14, 95–203.
- Sahu, S. K., Patnaik, K. K., Sharmila, M., & Sethunathan, N. (1990). Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3620–3622.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2014). *Bioprocess engineering : basic concepts*. Harlow, Essex : Pearson, cop. 2014.
- Stouthamer, A. H., & Versteveld, H. W. van. (1985). Stoichiometry of microbial growth. *Comprehensive Biotechnology*, 1, 215–238.
- Torija, M. J. (2002). *Ecología de levaduras. Selección y adaptación a fermentaciones vínicas*. Universidad Rovira i Virgili.
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van*

Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79(3-4), 345–352.

Villar Moreno, Á. L. (1992). *Sensibilidad a etanol en levaduras: Bases fisiológicas y análisis de métodos empleados en su determinación*. Universidad Complutense de Madrid.

Ward, O. P., & Calvo Rebollar, M. (1991). *Biotecnología de la fermentación : principios, procesos y productos*. Zaragoza : Acribia, 1991.



*En recuerdo a mi abuela que me dibujó haciendo lo que
realmente me gusta.*