



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA.

GRADU AMAIERAKO LANA

INGENIARITZA KIMIKOA

PSEUDOMONA SP-ren BIDEZ KATE
ERTAINEN GANTZ AZIDOEN ESTERASA
EKOIZTEKO BIO-ERREAKTORE BATEN
OPERAZIO BALDINTZEN ETA
ZINETIKAREN AZTERKETA

Ikaslea *Manso Fraile, Mireia*

Data *2015ko ekaina*

Zuzendaria

Federico Mijangos Anton
doktorea

Zuzendarikidea:

Fernando Hernando
Echevarria

Ikasturtea

2014/2015

AURKIBIDEA:

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | SARRERA | 1 |
| 2 | HELBURUAK | 3 |
| 3 | OINARRI TEORIKOAK | 4 |
| 3.1 | Mikroorganismodun errektore biologikoak | 4 |
| 3.2 | Mikroorganismodun erreakzioen zinetika | 5 |
| 3.2.1 | Hazkuntza zelularraren eredu zinetikoak | 5 |
| 3.2.2 | Parametroen estimazioa..... | 8 |
| 3.3 | Bio-erreaktorearen modelatzea..... | 10 |
| 3.3.1 | Txandakako errektoreak | 10 |
| 3.4 | Oxigenoaren transferentzia..... | 11 |
| 3.4.1 | Materia transferentziaren koefiziente kalkulatzeko korrelazioak | 12 |
| 3.4.2 | Irabiaketa mekanikoz barreiatu-rikopotentziaren kalkulurako korrelazioak | 13 |
| 4 | PROZEDURA EXPERIMENTALA | 14 |
| 4.1 | Mikroorganismoa..... | 14 |
| 4.2 | Fermentagailuko hazkuntza-likidoa eta inokulua..... | 14 |
| 4.3 | Bio-erreaktorea | 14 |
| 4.3.1 | Bio-erreaktoreko operazio baldintzak | 15 |
| 4.3.2 | Matrazeko operazio baldintzak | 15 |
| 4.4 | Biomasa-aren neurketa | 15 |
| 4.5 | Zentrifugazioa..... | 16 |
| 4.6 | Glukosaren kontzentrazio neurketa | 16 |
| 4.7 | Proteinaren neurketa | 17 |
| 4.8 | Entzimaren aktibitatearen neurketa | 18 |
| 4.9 | Esterasa proteinaren bereiketa operazioa mintzen bidezko prozesuaren bidez..... | 19 |
| 5 | EMAITZEN ANALISIA ETA EZTABAIDA | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1 | Bio-erreaktorean lortutako emaitzak | 20 |
| 5.1.1 | Biomasa kantitatea | 20 |
| 5.1.2 | Glukosaren kontzentrazioa | 22 |
| 5.1.3 | Proteina kantitatea | 22 |
| 5.1.4 | Esterasaren aktibitate entzimatikoa eta aktibitate espezifikoa | 24 |
| 5.2 | Matrazaetan lortutako emaitzak..... | 25 |
| 5.3 | Esterasa proteinaren bereizketa operazioa mintzen bidezko prozesuaren bidez | 27 |
| 5.4 | Parametro zinetikoen lorpena | 29 |
| 5.4.1 | Etekin faktoreak | 29 |
| 5.4.2 | Metodo diferentziala | 31 |
| 5.4.3 | Metodo integrala | 32 |
| 5.5 | Oxigenoaren transferentziaren eragina | 33 |
| 6 | ONDORIOAK..... | 41 |
| 7 | NOMENKLATURA | 43 |
| 8 | BIBLIOGRAFIA:..... | 46 |

1 SARRERA

Azkenaldian garrantzia handia eman zaio polimeroen biodegradagarritasunari ingurumenaren aurkako inpaktuaren eta teknologia biomediko askoren soluzio bezala aurkeztuz. Poliesterrek gaur egungo plastiko arrunten antzeko ezaugarriak dituzte eta prozesu petrokimikoen bitartez sintetizatu daitezke, baita iturri berriztagarrietatik ere. Biodegradagarriak diren polimeroen artean aurkitzen da 3-hidroxialkanoatoa (PHA). PHA mikroorganismo bitartez sintetizatzen den poliesterra da eta biosintesi hau bakterio mota desberdinetan gertatzen da hazkuntza desoreka baldintzetan (Gangoiti, 2012) karbono eta energi erreserba bezala.

PHA-ren abantailarik handiena plastikoen ezaugarri oso antzekoak izateaz gain mikroorganismoen bidez guztiz degradatzeko gai izatea da. Gainera, hainbat aplikazioetarako erabilgarria izan daiteke (medikuntzaren arloan, industria farmazeutikoan edota beste industria alorretan) bere biobateragarritasunari eta biodegradagarritasunari esker. Hori gutxi balitz, PHA-ren monomeroak oso baliotsuak izan daitezke antibiotiko, bitamina eta feromonen sintesiaren hasierako bitartekari bezala jokatzan dutelako, baita beste poliester berrien polimero blokeen sintesia lor dezaketelako ere. Hori dela eta, PHA-ren entzimen bidezko hidrolisia oso ikerketa interesgarria bilakatu da azkenaldi honetan.

PHA-ren despolimerasa extrazelularrak ingurunean eta baldintza extrazelularretan degradatzeko gaitasuna du. Despolimerasaren aktibitatearen arabera, PHA-ren degradazio entzimatiakoan lortutako produktuak monomeroak, monomero eta dimero, edo oligomeroen nahasketa bat izan daiteke.

Erreaktore biologikoak antzinatik erabili izan dira hartxidura alkoholdun edariak egiteko. Gaur egun, oster, hartxidura bioteknologikoa arlo askotan erabiltzen da: elikadura, ingurumenean, baliabideen eramangarritasunean, medikuntzako arloetan, etab (Levenspiel, 1999).

Bioteknologiaren aplikaziorik garrantzitsuenetariko bat entzimen produkzioa eta euren erabilgarritasuna da. Entzimek izaera proteikoa dute eta biokatalizatzaile bezala abantaila asko aurkeztu ditzakete hautakortasun eta espezifikotasun altua izategatik. Gainera, behar dituzten lan baldintzak gertuko ingurune fisiologikoetan aurkitzen diren berdinak edo oso antzerakoak izan ohi dira.

Hala ere, arazoak ere ekar ditzakete euren kostu altuagatik eta egonkortasun faltagatik baldintza ez fisiologikoetan lan egitean. Entzimaren aktibitatea tenperatura, presioa, pH eta aireztapena bezalako faktoreen arabera da eta hori dela eta beharrezkoa da faktore hauek aztertzea (A. Sanchez Ferrer, 1998).

PHA-k mikroorganismo desberdinen bidez katalizatuak izan daitezke, prozesu intrazelularren edo extrazelularren bidez. PHA-ren despolimerasak kate motzeko PHA-k (scl) hidrolizatzen (3 eta 5 karbono atomo) edo kate ertaineko PHA-k (mcl) hidrolizatzen (6 eta 14 karbono atomo inguru) espezifikoak dira. Halere, ezagutzen diren despolimerasa gehienak PHA-ren kate motzak hidrolizatzen bakarrik balio dute. *Pseudomonas putida*-ren despolimerasak kate ertaineko PHA hidrolizatzen aurkitutako lehen entzimak dira.

Esterasak (karboxilester hidrolasa E.C. 3.1.1.1.) hidrolasen familiako entzimak dira eta espezie askotan aurkitu izan dira. Euren funtzioa, kate ertaineko gantz azidoen

despolimerizazioaz arduratzea da. Polipeptidoz osatuta daude eta euren pisu molekularra 30 KDa ingurukoa izaten da.

PHA-ren hidrolisiak arlo ezberdinetan daukan garrantziaren ildotik abiatuta proiektu honetan *Pseudomona putida*-ren hartzidura aztertuko da. Mikroorganismo hau *Pseudomona* generoko interes industrial handiko bakterioa da. Bere genoma ezaguna da eta ostalari segurua da geneen klonazioa egiteko orduan lurzoruko bakterio hau.

2 HELBURUAK

Proiektu honen helburua esteraren lorpena aztertzeaz gain, lorpenerako erabilitako *Pseudomona putida* mikroorganismoaren hartidura aztertzea da, ondoren mikroorganismo horri dagokion parametro zinetikoak lortzeko eta erreaktore baten diseinua egin ahal izateko. Horrekin batera, hartiduran eragin dezaketen faktoreak aztertuko dira (tenperatura, aparra, aireztapena, pH ...) kontrol eta monitoriazioan kontutan izateko.

Horrez guztiaz gain eta prozesua erreaktorean aztertzeaz gain, matrazeetan ere aztertu da, ondoren bi sistemetako hazkuntzak konparatzeko eta aztertze helburuarekin.

Hartidura prozesuaren ostean, esterasa proteina lorpena mintzen bidezko prozesuetan oinarrituko da. Proiektu honetan mintzak duten eraginkortasuna kalkulatu da, baita lortutako emaitzen inguruko hausnarketa bat egin ere.

3 OINARRI TEORIKOAK

3.1 MIKROORGANISMODUN ERREAKTORE BIOLOGIKOAK

Mikroorganismoen metabolismoa seriean ematen diren zenbait erreakzioren multzoa da (bide metabolikoa) eta zelularen barruan gertatzen denez espezie erreakzionatzaileak bertaraino iritsi behar dira. Bide metabolikoaren oinarritzko unitatea entzimak katalizaturiko erreakzioa da. Beraz, zelulak aldi berean milaka erreakzio jasaten dituzten gunek dira.

Industriako prozesuen helburua nahi diren emaitzak emango dituen metabolismo osoaren zatia lortzea da. Prozesu horiek bio-erreaktoreetan burutzen dira elikagaien ingurunea kontrolatuz.

Aipatutakoaren arabera erreakzio biologikoek erreakzio kimikoekin alderatuta zenbait berezitasun dituzte:

- Erreakzio nahastearen konplexutasuna, mikroorganismoak (fase solidoa) eta izaera konplexuko substratuak baititu.
- Mikroorganismoen masa denboran zehar aldatuz doa.
- pH-a eta temperatura tarte estuan mantendu behar dira.
- Ur faseak ezin du mikroorganismoen hazkuntzan eragin dezakeen kutsatzailerik izan.
- Ekuazio zinetikoari buruz argibidea oro har mugatua da eta ekuazio enpirikoak erabiltzen dira.
- Kontzentrazioa masa bolumen unitateko (g L^{-1}) erabiltzen da molak bolumen unitatek erabili beharrean.

Mikroorganismodun erreaktoreak honela sailka daitezke:

- Jarioaren arabera: Nahaste perfektukoa, serieko tankeak edo pistoi jariokoa.
- Operatzeko eraren arabera: Txandakakoak, jarraituak edo erdi-jarraituak.
- Irabiaketa energia emateko metodoaren arabera: Gas fasean, likido fasean edo nahasian.

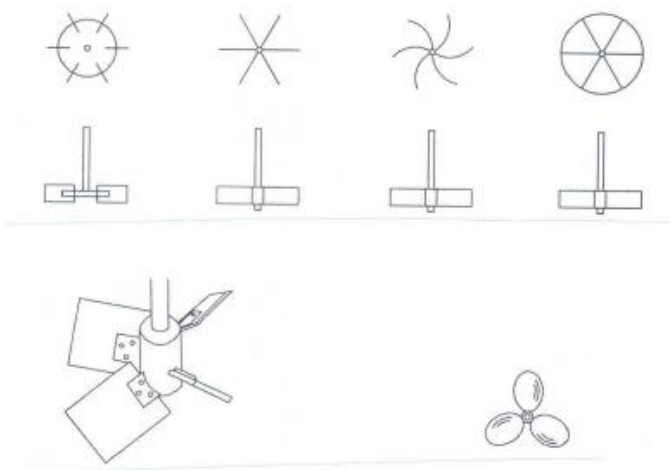
Sailkapen guztiak kontuan hartuta bio-erreaktoeren konfigurazio desberdinak lor daitezke:

- *Irabiatua (nahasia)*: Industrian erabiliena, txandaka, erregimen jarraituan edo erdi-jarraituan.
- *Hodi formako burbuileztatua (airlift erreaktoea)*: birzirkulaziorik gabe edo birzirkulazioarekin.
- *Hodi formako ohantze finkoa*: tratatu behar den likidoa edo gasa eutsitako mikroorganismoak edo entzimak dituen ohantzean zehar pasarazten da.
- *Hodi formako ohantze fluidizatua*: Aurrekoaren berdina baina eutsitako mikroorganismoak edo entzimak fluidizatuta daude.
- *Hodi formako gas-solido-likido erreaktoreak (trickle erreaktoea)*: Ohantze finkoaren aldaera da eta gas (aire tratamendu aerobioan) eta likidoa (ur kutsatua adibidez) norabide berean edo bata bestearen aurka (airea gorantz eta likidoa beherantz) pasarazten dira.

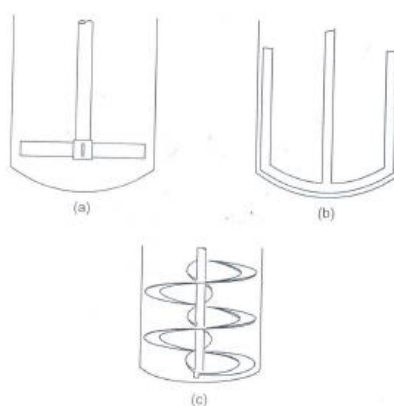
Proiektu honetan erabiliko den laborategiko bio-erreaktoea irabiatua izango da. Irabiaketa garrantzitsua da mikroorganismodun nahaste konplexuak homogeneizatzeko, bereziki biskositate eta uhertasun handikoak direnean. Irabiagailurik ohikoenak, biskositatea 5 N s m^{-2} baino txikiagoa denean ondorengoak izan ohi dira (ezkerretik eskuinera 1. Irudian):

diskodun turbinak, palak, kanpoko diskodun pala kurbatuak, pala okerrak eta helizeak. Ardatz berean 2 edo 3 irabiagailu izatea ohikoa da.

Biskositatea handia denean (10 N s m^{-2} baino handiagoa) eta erreaktorearen diametro handiaren ondorioz irabiaketa abiadura txikia denean paletak (a), aingura (b) eta hiru dimentsioko helizeak (c) erabiltzen dira (2.Irudia).



1.Irudia: Ohiko irabiagailuak.



2.Irudia: Abiadura baxuko irabiagailuak.

3.2 MIKROORGANISMODUN ERREAKZIOEN ZINETIKA

Bio-erreaktoreak modelatzearen helburua laborategiko bio-erreaktore baten lortutako datuetatik emaitza logikoak ateratzea da ondoren emaitza horiek eskala aldaketaren bidez bio-erreaktore industrial baten diseinua egiteko erabilgarriak izan daitezzen.

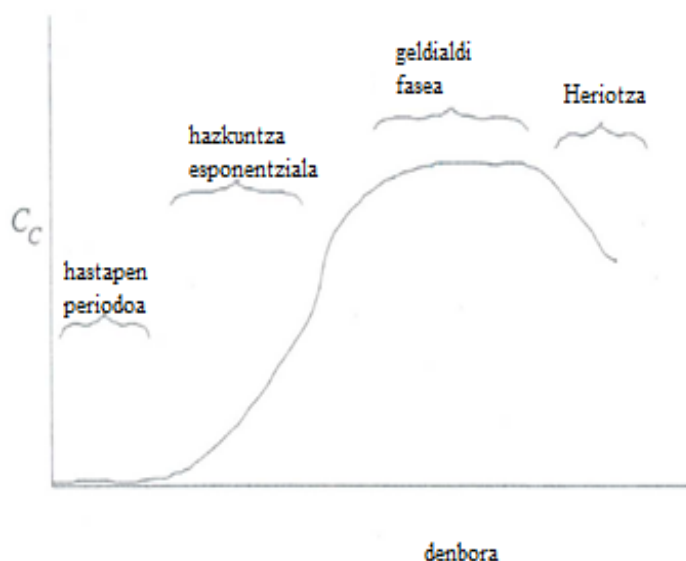
3.2.1 Hazkuntza zelularren eredu zinetikoak

Mikroorganismo zelularren hazkuntza zinetikoaren azterketa beharrezkoa da erreaktore biologikoak diseinatu ahal izateko. Hazkuntza zelularra erreakzio biokimiko eta egoera desberdinetan ematen den garraio fenomenoaren ondorioa da.

Hazkuntza zelularren zinetikaren azterketan faktore askok izan dezakete eragina: zelula zahar eta gazteen arteko etengabeko nahaste heterogeneoa, zelulak ingurura egokitu bitartean gertatzen diren baldintza fisiko eta kimikoen etengabeko aldaketak, etab. Arrazoi guzti horiengatik ezinezkoa da aspektu guztiak biltzen dituen formula bat aurkitzea eta beharrezkoa suertatzen da suposizioetara eta sinplifikazioetara jo beharra. Eredurik errazena eredu *ez-egituratu eta ez-segregatua* da eta ondorengo suposizioak hartzen ditu bere baitan:

- Zelulak konposatu simple bat bezala adieraz daiteke (adibidez: masa zelular, zelula zenbaki edo proteina kontzentrazio bezala).
- Zelula-populazioa uniformeki banatuta dago. Hau da, zelula suspentsioa homogeneoa da eta zelulen itxura heterogeneoa alde batera uzten da.
- Erreakzio abiaduraren mugatzailea hazkuntza-likidoko konposatu bakarra izango da. Beste konposatu guztiak kontzentrazio altuetan egon ohi dira, erreakzio abiaduran eraginik ez izateko.
- Bio-erreaktoerek ingurumen baldintza konstanteetan egiten dute lan; hori dela eta prozesuan zehar pH-a, tenperatura edo disolbaturiko oxigeno kontzentrazioak kontrolatzen dira.

Txandakako erreaktoeran denboran zehar hurrengo irudian erakusten diren etapak gertatzen dira denboran zehar:



3. Irudia: Mikroorganismoaren txandakako prozesuaren etapak.

- 1) *Indukzio edo hastapen periodoa*: Baldintza berrietara egokitzeko mikroorganismoak behar duten denbora, entzima berriak sortu behar baitituzte euren barne prozesuetarako.
- 2) *Hazkunde esponentzialaren periodoa*: Tarte honetan elikagaien kontzentrazioa eta zelularen hazkundera mugatzen duten faktoreak ia ez dira aldatzen.
- 3) *Denbora geldikorra*: Tarte honetan mikroorganismoen ugalketa geldotu egiten da kontzentrazioa konstantea eta elikagaien asimilazioa kontsumo metabolikoaren berdina den

arte. Hazkunde abiadura geldotzea elikagaiak urritzeari edo hazkundera inhibitzen duten emaitza metabolikoen formazioari egotzi dakioko.

4) *Heriotza*: elikagaiak falta direnean, zelulek eurek metaturiko materia organikoa kontsumitzen dute.

Monod-en ekuazioak (Monod, 1942) mikroorganismoaren hazkuntzaren interakzioak deskribatzen ditu substratu guztia biomasa bilakatzen den eta substratu mugatzailea dagoen sistematarako. Ondorengo adierazpenaren bidez azaltzen da Monod-en ekuazioa:

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad (1)$$

r_x zelulen erreakzio abiadura izanik, μ_m hazkuntza abiadura espezifiko maximoari eta K_s Monod-en konstanteari. Ekuazio hori abiadura espezifikoaren funtzioan ere adieraz daiteke:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (2)$$

Beraz, μ_m hazkuntza abiadura maximoa izango da $S \gg K_s$ denean. K_s , hazkuntza abiadura espezifikoaren balioa bere maximoaren erdia izateko behar duen mantengai mugatzailearen kontzentrazioa da.

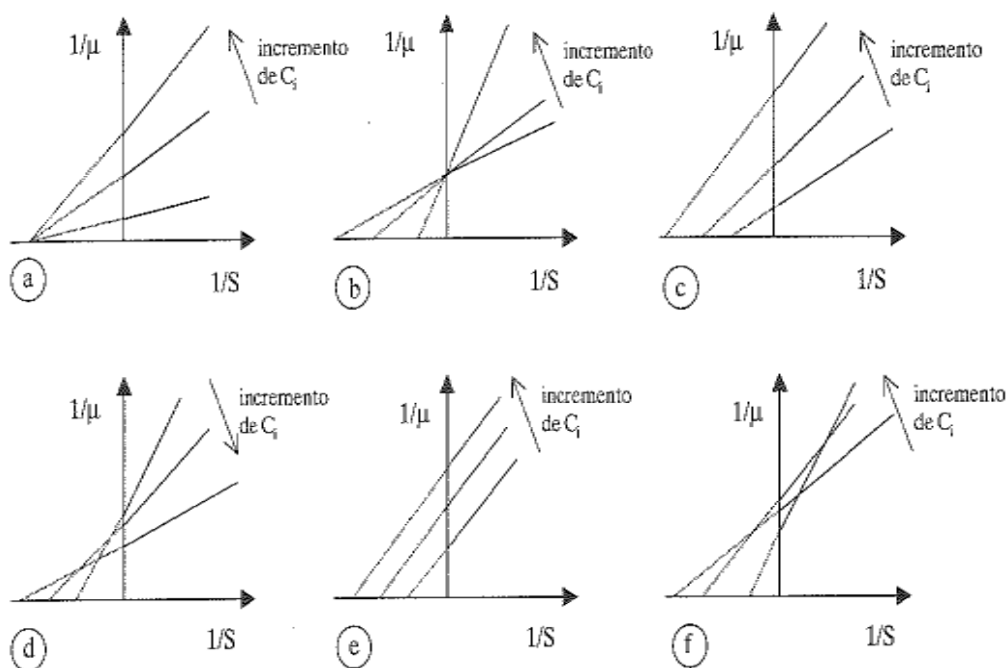
Monod-en ekuazioa sinpleenetarikoa da eta ez du beti ondo adierazten mikroorganismoaren hazkuntza. Hori dela eta, beste modelo batzuk ere garatu dira. Han eta Levenspiel-ek Monod-en ekuazio jeneralizatua proposatzen dute. Ekuazio hau egoera gehienak kontutan hartzen saiatzen da (Blanch eta Clark, 1996):

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^n \frac{S}{S + K_s + \left(1 - \frac{C_i}{C_i^*}\right)^m} \quad (3)$$

n eta m konstanteak inhibitzailearen indar toxikoarekin erlazionatzen dira gehienetan, eta C_i -ren lekuan S , P edo X -ren ordez ordezkaturiko da inhibizioa substratua, produktua edo zelula bera inhibitzailea bada.

Produktuaren bidezko inhibizioa bada ($C_i=P$) edo zelula bera inhibitzailea bada ($C_i=X$), (3) ekuazioko konstanteak Lineweaver-Burk-en errepresentazio linealaren bitartez balioztatu daiteke. 4. Irudian inhibizioaren 6 egoera desberdinak ageri dira:

- a) Inhibizio ez-konpetitiboa: $n>0$ eta $m=0$.
- b) Inhibizio konpetitiboa: $n=0$ eta $m<0$.
- c) Inhibizio jeneralizatua: $n>m>0$.
- d) Inhibizio jeneralizatua: $m>n>0$.
- e) Inhibizio ez-lehiakorra: $n=m>0$.
- f) Egoera orokorra: $n>0$ eta $m<0$.



4.Irudia: Lineweaver-Bursk en errepresentazio grafikoa produktu bidezko inhibizio desberdinetarako Hans eta Levenspiel-en ereduaren arabera.

3.2.2 Parametroen estimazioa

Proiektu honetan mikroorganismoaren hazkuntzaren azterketa Monod-en ekuazioan oinarrituko da. Monod-en ekuazio zinetikoko parametroak lortu ahal izateko hainbat metodo daude. Atal honetan metodo diferentzialaren eta metodo integralaren prozedurak azalduko dira ondoren laborategian lortuko diren balioekin parametro zinetikoak kalkulatu ahal izateko.

3.2.2.1 Metodo diferentziala

Metodo diferentzialaren helburua denboran zehar biomasa hazkuntza abiaduraren ebaluazioa aztertzea da datu esperimentaletatik abiatuta. μ_m eta K_s -ren parametroen lorpena ondorengo erlazio linealean oinarritzen da, 2. Ekuazioaren linealizazioan hain zuzen ere:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} \quad (4)$$

$1/\mu$ versus $1/S$ grafikoki irudikatuz gero, K_s/μ_m malda eta $1/\mu_m$ jatorriaren ordenatua duen lerro zuzen bati egokitu behar zaio.

Linealizazio hau egin ahal izateko beharrezkoa da S -ren eta μ -ren balioak izatea. S substratuaren kontzentrazioa izango da. μ (abiadura espezifikoa) hazkuntza abiaduraren bidez lortuko da ondorengo ekuazioa erabilita (A. Duarte Torres):

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

$$\mu = \frac{dX/dt}{X} \quad (6)$$

Kasu honetan hazkuntza abiadura, biomasaren kontzentrazio denborarekiko deribatuz lortzen da.

3.2.2.2 Metodo integrala

Metodo integrala Monod-en ekuazioaren integrazioan oinarritzen da:

$$X = X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S) \quad (7)$$

X_0 eta S_0 biomasaren eta substratuaren hasierako kontzentrazioak dira.

(7) ekuazioa (5) ekuazioan ordezkatzten bada, hurrengo ekuazioa lortzen da:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_s + S} (X_0 + Y_{x/s} \cdot (S_0 - S)) \quad (8)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} [X_0 + Y_{x/s} (S_0 - S)] \quad (9)$$

$$\int_{S_0}^S \frac{K_s + S}{S[X_0 + Y_{x/s}(S_0 - S)]} dS = -\frac{\mu_m}{Y_{x/s}} \int_0^t dt \quad (10)$$

$$\frac{1}{t} \ln \frac{S}{S_0} = b \frac{[\ln(1 + a \cdot d)]}{t} - c \quad (11)$$

Non:

$$a = \frac{Y_{xs}}{X_0} \quad (12)$$

$$b = 1 + \frac{1}{Y_{xs} K_s} [X_0 + Y_{xs} S_0] \quad (13)$$

$$c = \frac{\mu_m}{Y_{xs} K_s} [X_0 + Y_{xs} S_0] \quad (14)$$

$$d = (S_0 - S) \quad (15)$$

11. ekuazioak (Gates y Marlar, 1968) erlazio lineal bat aurkezten du: $[(1/t)\ln(S/S_0)]$ eta $[(1/t)\ln(1+a \cdot d)]$. Beraz, linealizazioaren bidez eta zuzen batera egokitzen den a,b eta c-ren parametroak estimatuz Monod-en ekuazioko parametro zinetikoak lortuko dira:

$$\mu_m = \frac{c}{b-1} \quad (16)$$

$$K_s = \frac{1}{\frac{1}{a} + S_0} \quad (17)$$

$$Y_{xs} = aX_0 \quad (18)$$

3.3 BIO-ERREAKTOREAREN MODELATZEA

Bio-erreaktorearen modelatzearen helburua zentzuzko emaitzak lortzea da laborategiko erreaktore batetik abiatuta erreaktore handiago bat diseinatzeke. Modelatua ondo eginez gero lortutako informazioa interes handikoa izango da diseinuarekin jarraitzeko.

Horregatik, ondorengo suposizioak egingo dira kalkuluak sinplifikatzeko asmoz:

- Laborategiko bio-erreaktorea ondo irabiatuta dago, baldintza homogeneoetan.
- Ez dago zelula hilik.
- Ez da etanolik lortzen.
- Prozesuko substraturik garrantzitsuenak karbonoa eta nitrogenoa dira.
- Gehiegizko oxigeno elikadura dago.

Aurrez aipatu bezala mikroorganismodun erreaktoreak operatzeko baldintzen arabera 3 taldetan sailkatzen dira:

- Txandakako erreaktoreak: Batch.
- Erreaktore erdi-jarraituak: Fed-batch.
- Erreaktore jarraituak.

Proiektu honetan txandakako erreaktoreak aztertuko dira laborategiko erreaktorea mota honetakoa delako.

3.3.1 Txandakako erreaktoreak

Industriaren arloari dagokionez erreaktorerik arruntenak eta erabilienak dira. Erreaktore ez-jarraituak gehienetan elikadura industria, farmazia eta bioteknologia alorretan erabiltzen dira. Erreaktore hauen abantaila baldintza aseptikoak lortzen dutela da. Bestalde, martxan jartzean eta geldialdi puntuetan suertatzen den eraginkortasun falta aurkezten dute desabantaila bezala. Gainera, amaierako etapan, baldintzak ez dira oso lagungarriak eta prozesuaren hazkuntza murriztu egiten da.

Erreaktore biokimikoen diseinua eta analisisa egiteko beharrezkoa da erreakzio zinetikoaren gaineko ezagutza izatea, baita materia eta energia balantzearen gainekoa ere:

Aurreko ekuazioan garatuz ondorengo ekuazioa lortzen da:

$$\text{—————} \quad (19)$$

Mikroorganismodun prozesuak errazago aztertzeke honako zatidura hauek konstante dirautela kontsideratzen da mikroorganismo-substratu sistema konkretuetarako:

$$Y_{xs} = \frac{r_x}{r_s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (20)$$

Txandakako erreaktoreen diseinu ekuazioan edo mikroorganismoen materia balantzean, Monod-en eredu zinetiko ez-gituratuaren kasurako sarrera eta irteera elikadura nuluak dira eta aurreko ekuazio honela labur daiteke:

$$- \quad (21)$$

Bolumena prozesu osoan zehar konstante mantentzen denez ekuazioa integratuz gero hazkuntza zelularra lortzeko beharrezko denbora kalkula daiteke (Levenspiel, 1999):

$$- \quad (22)$$

$$\mu t = \left(\frac{K_s}{X_0 + Y_{xs} S_0} + 1 \right) \ln \frac{S}{S_0} - \left(\frac{K_s}{X_0 + Y_{xs} S_0} \right) \ln \frac{X}{X_0} \quad (23)$$

Azken ekuazioa hau mikroorganismoaren eta substratuaren kontzentrazioen erlazioa kontutan hartuta lortzen da. Erreakzio denbora totala kalkulatzeko indukzio denbora gehitu beharko zaio (23) ekuazioaren bidez kalkulatu denborari.

3.4 OXIGENOAREN TRANSFERENTZIA

Zenbait egoeratan materia transferentziak erreakzio abiadura mugatzen du:

- Hartzidura aerobioetan, mikroorganismoek oxigenoa behar baitute emariaren elikagaiez gain.
- Mikroorganismoak banaka ez daudenean, euskarriaren gainean film moduan baizik. Erreakzionatzaileak lehenengo difusioz zeharkatu behar du kanpoaldeko geruza eta ondoren biomasan zehar barneren dauden mikroorganismoetaraino heldu.
- Mikroorganismoak flokuluetan eskegita daudenean. Kasu honetan ere kanpoaldeko eta barnealdeko kontzentrazioen gradienteak egongo dira.

Lan honetako erreaktorean aireztapena dago prozesu aerobioetan oxigenoa sartu behar baita zelularen metabolismoa mantentzeko. Hori dela eta, erreakzio abiadura materia transferentziatik mugatuta dagoen aztertu beharko da.

Geruza bikoitzaren ereduaren arabera (Whitman, 1932) gas fasetik likido faserako oxigenoaren garraioa likidoaren aldeko geruzan zehar gertatzen den difusioak kontrolatzen du. Faseen arteko erresistentzia globala honakoa da:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_l} + \frac{1}{H_A k_g} \quad (24)$$

Oxigenoaren H Hery-ren konstante oso handia denez, bigarren batugaia lehenengoa baino askoz ere txikiagoa da, eta, beraz, $K_L \approx k_l$. Erreaktorean oxigenoaren transferentzia bolumen unitateko ondorengoa da:

$$N_{O_2} = \frac{dC_{O_2}}{dt} = k_1 a (C_{O_i} - C_O) \quad (25)$$

k_1 geruza likidoan gertatzen den oxigenoaren materia transferentzia koefizientea da ($\text{mg m}^2 \text{s}^{-1}$). C_{O_i} oxigenoaren kontzentrazioa fase-artean, C_O oxigenoaren kontzentrazioa likidoan eta a fase-artearen azalera likidoaren bolumen unitateko.

$$N_{O_2} = \frac{dC_{O_2}}{dt} = k_1 a (C_{O_i} - C_O) \quad (25)$$

3.4.1 Materia transferentziaren koefiziente kalkulatzeko korrelazioak

Oxigeno transferentziaren *kla* koefizientea ((25) ekuazioan behar dena) kalkulatzeko korrelazio mota bi proposatu dira:

1. *Analisi adimentsionalean oinarriturikoak*: Modulu adimentsionalez osaturiko adierazpenak dira, $Sh=f(Re, Sc, Fr\dots)$
2. *Erreaktorearen bolumen unitateko barrieturiko potentziaren funtzioak*.

Materia transferentziaren kalkulua azkeneko korrelazio honetan oinarrituko da. Korrelazio honen adierazpen orokorra hurrengoa da:

$$k_1 a = C \left(\frac{P_g}{V} \right)^a (v_s)^b \quad (26)$$

C, a eta b sistema esperimentalaren arabera dira. Egile desberdinak parametro hauetarako era esperimentalean lorturiko balioak 1. Taulan erakusten dira. Taula honetan T erreaktorearen diametroa da.

3.1. Taula: Zenbait egilek sistema desberdinak erabiliz lorturiko (26) ekuazioaren koefizienteak.

| Sistema | C | a | b | Condiciones de operación | Referencia |
|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|---|--------------------|
| Aire-agua | 0.001 | 0.6 | 0.8 | | Figueiredo (1979) |
| Aire-agua | 0.026 | 0.4 | 0.5 | | Van't Riet (1979) |
| Aire-agua | 2.04×10^{-3} | 0.68 | 0.56 | $T = 0.18 \text{ m}, V_g = 0.98\text{-}3.3 \text{ mm/s}, N = 6.6\text{-}12.5 \text{ rps}$ | Arjunwadkar (1996) |
| Aire-agua | 1.5×10^{-3} | 0.59 | 0.55 | $T = 0.232 \text{ m}, Q_g = 0.1\text{-}0.7 \text{ vvm}, Re > 1000$ | Nocentini (1993) |
| Aire-agua | 1.77×10^{-2} | 0.58 | 0.588 | $T = 0.19 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}8.48 \text{ mm/s}, N = 5.5\text{-}18.8 \text{ rps}$ | Moucha (1995) |
| Aire-agua | 8.61×10^{-3} | 0.637 | 0.54 | $T = 0.19 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}8.48 \text{ mm/s}, N = 5.5\text{-}18.8 \text{ rps}$ | Linek (1996) |
| Aire-agua | 4.85×10^{-3} | 0.583 | 0.4 | $T = 0.29 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}4.24 \text{ mm/s}, N = 4.17\text{-}14.17 \text{ rps}$ | Linek (1987) |
| Aire-agua | 8.3×10^{-3} | 0.62 | 0.49 | $T = 0.392 \text{ m}, P_g/V = 0.125\text{-}4 \text{ W/m}^3$ | Vasconcelos (2000) |
| Aire- Na_2SO_4 | 3.96×10^{-3} | 0.82 | 0.38 | $T = 0.18 \text{ m}, V_g = 0.98\text{-}3.3 \text{ mm/s}, N = 6.6\text{-}12.5 \text{ rps}$ | Arjunwadkar (1996) |
| Aire- Na_2SO_4 | 5.25×10^{-4} | 1.17 | 0.46 | $T = 0.19 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}8.48 \text{ mm/s}, N = 5.5\text{-}18.8 \text{ rps}$ | Linek (1996) |
| Aire- Na_2SO_4 | 2.52×10^{-3} | 1.03 | 0.554 | $T = 0.19 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}8.48 \text{ mm/s}, N = 5.5\text{-}18.8 \text{ rps}$ | Moucha (1995) |
| Aire- Na_2SO_4 | 1.35×10^{-2} | 0.946 | 0.4 | $T = 0.29 \text{ m}, V_g = 2.12\text{-}4.24 \text{ mm/s}, N = 4.17\text{-}14.17 \text{ rps}$ | Linek (1987) |
| Aire- CMC | 8.16×10^{-4} | 0.68 | 0.4 | $T = 0.18 \text{ m}, V_g = 0.98\text{-}3.3 \text{ mm/s}, N = 6.6\text{-}12.5 \text{ rps}$ | Arjunwadkar (1996) |
| Aire- Medio rico ⁽¹⁾ | 2.4×10^{-3} | 0.725 | 0.892 | $T = 0.18 \text{ m}, V_g = 0.98\text{-}5.2 \text{ mm/s}, N = 0.83\text{-}5 \text{ rps}$ | Shukla (2001) |
| Aire- Medio rico ⁽²⁾ | 0.032 | 0.95 | 0.41 | $T = 0.13\text{-}0.21 \text{ m}, V_g = 2.8\text{-}6 \text{ mm/s}, N = 1.67\text{-}11.7 \text{ rps}$ | Montes (1996) |

Medio rico⁽¹⁾: 2 % peptona, 3 % glucosa, 1 % extracto de levadura. Medio rico⁽²⁾: 1 % glucosa, 6,7 g/L YNB sin aminoácidos.

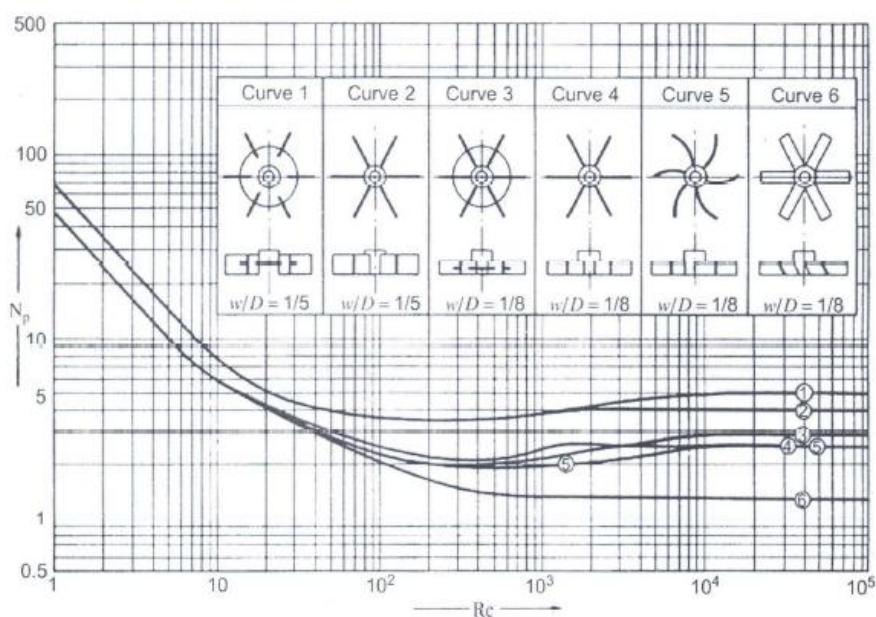
3.4.2 Irabiaketa mekanikoz barreiatuak potentziaren kalkulurako korrelazioak

P_g gaiaren kalkulua azalduko da, aurreko (26) ekuazioko korrelaziorako behar baita oxigenoaren transferentzia koefizientea kalkulatzeko.

P_g potentzia, N_p irabiaketa potentziaren moduluarekin lotuta dago (Rushton et al., 1950):

$$N_p = \frac{P_g}{\rho N^3 D_i^5} \quad (27)$$

Potentzia modulua (N_p) operazio baldintzen menpekoa da. Zenbait turbinetarako N_p -ren eta Reynolds modulua arteko lotura 4. Irudian erakusten da:



5.Irudia: Irabiaketa moduluaren eta Reynolds moduluaren arteko lotura zenbait turbinetarako. C. Casas, 2005.

4 PROZEDURA EXPERIMENTALA

Atal honetan prozesu esperimentalean erabilitako prozesuak, materialak eta ekipoak azalduko dira. Lortutako emaitzak hobeto ulertze aldera proteinaren ezaugarriak, mikroorganismo mota, berreskuratze moduak eta beste hainbat ezaugarri ere azalduko dira.

4.1 MIKROORGANISMOA

Aurretik azaldu den bezala, proiektuan landu den mikroorganismoa *Pseudomona putida* izan da: Gram negatibodun bakteria, mesofiloa eta aerobioa. *Pseudomona putida*, *Pseudomona fluorescens* taldearen barnean sartzen da eta euren ezaugarri nagusia ingurune arruntetan hazteko duten gaitasuna da, konposatu organiko mota askoz baliatuz. Hortaz gain, hidrokarburoak degradatzeko gai dira (toluenoa, bentzenoa eta etil bentzenoa hurrenez hurren). Flagelo polar bakarra edo bat baino gehiago izan ditzakete mugimendua ahalbideratzeko. Hazkuntza optimorako tenperatura 25-30°C bitartekoa izan ohi da eta pH 6-8 ingurukoa (Gómez Romero, 2008).

4.2 FERMENTAGAILUKO HAZKUNTZA-LIKIDOA ETA INOKULOIA

Saiakuntzan erabilitako hazkuntza-likidoa M63 (Miller, 1972) bezala ezagutzen da, eta honen edukia ondorengoa da: 13,6 KH₂PO₄ g/l , 2 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 mg/l FeSO₄7H₂O, 0,6% (w/v) kasaminoazido eta 20 g/l (NH₄)₂SO₄ eta 10µg/ml filtrazio bidez esterilizatutako gentamicina. Gainera, 0,36 % (w/w) filtrazio bidez esterilizatutako glukosa gehigarria du. Guzti hau pH 7-ra doitu beharko da. pH erregulatzailerik bezala 200 ml azido zitriko (0,5M) eta 200 ml KOH (0,9 M) erabiliko dira.

Inokuluaren prestakuntzarako lehendabizi 8-9 LB agar plaketan (gentamicina 10µg/ml) erein behar da 30°C-tan 24-72 orduz. Ondoren, agar plaka bakoitzean 2 ml ur destilatu eta esterilizatu gehituko dira agarreko sustantziak diluitzeko helburuarekin. Azkenik, xiringa baten bidez petri plakako likidoa batu eta gutxi gorabehera lortutako 20 ml-ekin bio-erreaktorera inokulatuko dira xiringa baten bidez eta esterilizazio baldintzetan.

4.3 BIO-ERREAKTOREA

Erabilitako bio-erreaktorea Minifors Infors HT markako laborategiko bio-erreaktorea da 5 L ko beirazko bolumen totala eta 370 mm-ko diametroa dituena. Bio-erreaktorea pH neurgailuekin, irabiatze abiadura kontrolatzaileekin, tenperatura, elikadura, aparraren kontrako nibela eta diluitutako oxigeno kontrolatzaileekin ekipatuta dago. 2. Irudian ikusten den bio-erreaktorea da laborategian erabili dena.



6.Irudia: Laborategian erabilitako Minifors infors HT bio-erreaktorea.

4.3.1 Bio-erreaktoreko operazio baldintzak

Bio-erreaktorean aurretik aipatutako M63 hazkuntza-likidoaren 3 litro gehitzen dira (glukosa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eta gentamicina gehigarriekin) ondorengo baldintzetan: 30°C -ko temperatura, 250 rpm-ko abiadura irabiatuz, pH 7-an eta %50-eko aireztapenarekin. Glukosa gehigarria hustu ondoren aparraren aurkako eragilea gehitzen da aparra ekiditeko, kasu honetan 200 ml etilenglikol (%4) erabiliko dira. pH-aren erregulatuzaileak ere bio-erreaktorera konektaturik egon beharko dira. Hau guztia gertu dagoenean, aurretik azaldu den bezala mikroorganismoa inokulatuko da.

4.3.2 Matrazeko operazio baldintzak

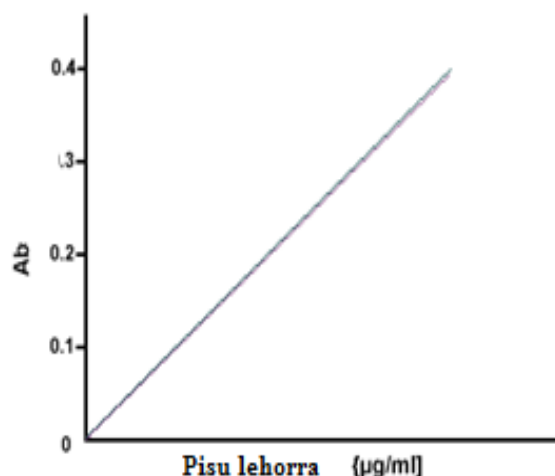
Praktika honen helburua *Pseudomona putida* mikroorganismoaren hazkuntza aztertzea da 3 litroko bio-erreaktore batean. Hala ere, hazkuntza hau hobeto aztertzeko, bio-erreaktorean inokulatzeaz gain, 8 matrazetan ere inokulatuko da M63 hazkuntza likidoaren 100 ml. Likidoaz gain 2,5 ml glukosa, 0,1 ml gentamicina eta anduia gehituko dira mikroorganismoaren errendimendua eta aktibitate entzimatikoa bio-erreaktorean lortutakoarekin konparatu ahal izateko. Matraze hauek erein eta gero, inkubagailu orbital baten uzten dira 30°C eta 120 rpm-tan.

4.4 BIOMASAREN NEURKETA

Bio-erreaktorean dagoen mikroorganismo kantitatea kalkulatzeko uhertasunaren metodoa erabiliko da. Metodo hau argi izpi bat bidaltzean oinarritzen da: argiak laginean suspentsioan dauden partikulen kontra talka egitean argiaren parte bat islatua, beste parte bat sakabanatu, beste parte bat xurgatu, beste parte bat desbideratu eta beste bat igorri egingo duelarik. Uhertasunak sakabanatutako argia neurtzen du.

Suspentsioan dauden mikroorganismo kantitatearen edo mikroorganismo bideragarrien kantitatearen estimazio bat egin ahal izateko lehendabizi kalibrazio kurba bat egin behar da. Absorbantzia mikroorganismoaren pisu lehorrarekin zuzenki proportzionala da.

Kalibrazio kurba bat lortzeko, 600 nm-tan lagin desberdinen absorbantziak neurtuko dira. Hazkuntza-likidoa zuria izango da. Absorbantziak neurtu ostean laginen bolumena lehortu beharko da. Horretarako laginak laba batean sartuko dira 105°C-tan eta bertan mantendu egun batez ura lurruntzeko. Azkenik, laginak pisatu egingo dira absorbantzia bakoitzari dagokion kontzentrazioak lortzeko, 3.irudian ikus daitekeen bezala.



7.Irudia: Absorbantzia pisu lehorren menpe

Behin kalibrazio kurba lortuta eta zuzenki proportzionala dela jakinda denboran zehar bio-erreaktoreko laginen absorbantziak neurtuz bakterioaren kontzentrazio zelularra ezagutuko da.

4.5 ZENTRIFUGAZIOA

Ondoren azalduko diren neurketak egin ahal izateko (glukosa kontzentrazioaren neurketa, proteina kantitatearen neurketa eta aktibitate entzimatiakoaren neurketa) laginak zentrifugatu egin behar dira. Horretarako 15 minutuz 13000 g-tan zentrifugatzen utzi eta ondoren flotatzen geratzen dena gorde egingo da beranduago erabiltzeko. Likido hau zuzenean aztertu daiteke edo bestela hozkailuan gorde daiteke berriz behar izan arte.

4.6 GLUKOSAREN KONTZENTRAZIO NEURKETA

Glukosaren kontzentrazioa neurtzeko “Glucose Liquicolor” sistema erabiliko da. Metodo hau lagina eta errektibo bat nahastean oinarritzen da. Pixka batean itxaron ondoren koloredun konposatu bat sortuko da zeina espektrofotometroaren bidez 500 nm-tan neurtuko den. Aparatua doitzeko glukosarik gabeko lagina zuria izango da (erreaktiboarekin bakarrik). Kontuan hartu behar da neurketa hau zeharkakoa dela eta glukosaren benetako kontzentrazioa lortzeko unitate aldaketak egin behar direla. Horregatik, glukosa kontzentrazioa ezagutzen den soluzio baten absorbantzia neurtuko da (lagin estandarra).

Beraz, jarraitu beharreko pausuak hauek dira: lehenengo, hodi batean lagin zuria prestatu beharko da (honek bakarrik 1 ml errektibo izango du). Beste hodi batean, soluzio estandarra (std) prestatuko da. Hodi honetan 1 ml errektibo eta 0,01 ml soluzio estandar jarriko dira eta

beste hodi batean 1 ml errektibo eta jakin nahi den glukosa laginaren 0,01 ml hartuko dira. Ondoren, hodiak nahastu eta inkubatzen utziko dira 5 minutuz 37°C-tan.

Espektrofotometroa 500 nm-tan ipini eta zuriarekiko beste laginen absorbantziak neurtuko dira, baita lagin estandarren absorbantzia ere. Glukosa kontzentrazioa neurtzeko zuriarekiko duen erlazio estekiometrikoaren bidez kalkulatu da.

4.7 PROTEINAREN NEURKETA

Proteina kantitatea jakiteko Bradford-en metodoa erabiliko da. Bradford-en metodoa proteinak kuantifikatzeko erabiltzen da eta lagineko proteina kontzentrazioaren presentziaren ondorioz gertatzen den kolorante baten absorbatntzia aldaketan oinarritzen da.

Kontzentrazio ezezaguneko laginaren 1 ml entzima disoluzio diluitua erabiltzen da eta ondoren 1 ml Bradford errektiboa gehitzen da. Hori egin aurretik kurba patroia bat gertatu behar da. Patroi bezala erreferentziatzeko proteina bat erabili beharko da, kasu honetan seroalbumina bobina (BSA, 0,01 mg/ml). Seroalbumina bobinaren kurba patroia 0 eta 1000 µl artean egingo da. Hodi estandarrei 1 ml errektibo Bradford gehitu beharko zaie, baita ezezagunak diren laginei ere, ondorengo taulan azaltzen den bezala:

4.1. Taula: Proteinaren patroia kurba.

| Hodia | Zuria | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| BSA (µl) | 0 | 50 | 100 | 200 | 300 | 500 | 1000 |
| H ₂ O (µl) | 1000 | 950 | 900 | 800 | 700 | 500 | 0 |
| Bradford errektiboa (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

4.2. Taula: Laginen proteina kontzentrazioa jakiteko irizpideak.

| Hodia | M1 (t=24 h) | M2 (t=48 h) | M3 (t=72 h) | M4 (t=168 h) |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Lagina, entzima diluitua (µl) | 50 | 50 | 50 | 50 |
| H ₂ O (µl) | 950 | 950 | 950 | 950 |
| Bradford errektiboa (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 |

Ingurugiro tenperaturan utzi, hodi guztiak eskuarekin poliki-poliki irabiatu eta absorbatzia 595 nm-tan neurtuko da zuriaren aurrean.

Amaitzeko, kalibrazio kurba irudikatu, extintzio koefizientea kalkulatu eta M1, M2, M3 eta M4 laginen proteina kontzentrazioa kalkulatu da. Lortutako emaitza guztiak *emaitzen azterketa eta eztabaida* atalean daude adierazita.

4.8 ENTZIMAREN AKTIBITATEAREN NEURKETA

Entzimaren aktibitate unitatea (U) 1 μmol substraturen konbertsioa minutu batean katalizatze erabiltzen den entzima kantitatea da.

Aktibitate espezifikoa berriz, proteina miligramoko edo mililitroko askatutako entzima unitate kantitatea da.

Entzimaren aktibitatearen neurketa substantzia kimiko bat gehitzean oinarritzen da. Esterasak errektibo honekin erreakzionatu egiten du eta horrela aktibitatea laginaren absorbantzia zuriarekiko neurtuz lortzen da. Aktibitate entzimatikoa neurtzeko orduan, espektrofotometrikoki egiten da 30°C-tan 400 nm-tan 20 minutuz p-nitrofenol-ren agerpena jarraituz, p-nitrophenyloctanoato (p-NPO) substratu bezala erabiliz.

Hasiera batean, 1000 μmol tanpoi bikarbonato-NaOH 200 mM (pH 9,5), 100 μL estraktu entzimatikoa eta 500 μL ur distilatu (Milli Q) pipeteatu ziren 2 ml-tako kubeta batean. Nahastea 30°C-tan zegoenean, erreakzioari hasiera ematen zitzaion 100 μL pNPO substratu gehituz. Kontrol bezala, substratuaren auto-hidrolisia saihesteko, kubeta bat gehiago erabiltzen da zeinetan estraktu entzimatiakoaren ordez ur distilatua gehitzen den.

Praktika hau egiterako orduan arazo batekin egin zen topo, izan ere, p-NPO gehitzean entzimek hauspeatu egiten zuten. Arazoari aurre egiteko aurreko proba kontzentrazio desberdinekin eta tanpoi desberdinekin egiten saiatu zen. Azkenean, H.Kim-en (2000) artikuluari esker hurrengo metodoa erabili da: 800 μL Tris-HCl 50 mM (pH 9,0) duen tanpoi bat eta 100 μL entzima dituen nahastea prestatu. Lagina inkubatzen utzi 30°C-tara heldu arte eta ondoren 100 μL substratu 10 mM p-NPO gehitu. Hori guztia ondo nahastu eta 20 minutu igaro ondoren (erreakzioari amaiera ematen zaion unea) 100 μL SDS %10 eta 900 μL ur distilatu Milli Q gehitu. Azkeneko bolumen totala 2 ml-koa izango da. Nahastu eta absorbantzia 400 nm neurtu zuriarekiko. Zuriak estraktu entzimatiakoaren ordez ur destilatua izango du.

Absorbantziak lortu ondoren, aktibitate entzimatikoa zehazteko Lambert-Beer-en ekuazioa erabiliko da:

$$Ab = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (28)$$

l kubetaren luzera izango da (cm-tan), C solutuaren kontzentrazioa (mol/L) eta ε extrikziozko koefiziente molarra ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Kasu honetan nitrofenilato ioiaren (pH 9,5) $\varepsilon = 16,64 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ eta $l = 1 \text{ cm}$ da.

Zehaztu nahi dena 1 μmol p-NPO desagertzean sortzen den entzima kantitatea da. Beraz, aktibitate entzimatikoa hurrengo ekuazioaren arabera definiturik geratuko da:

$$A = \frac{dC}{dt} = \frac{\Delta Ab / t}{\varepsilon \cdot l} f_d \quad (29)$$

f_d diluzio faktorea da, hau da, V_i/V_m . V_m estraktu entzimatiakoaren lagina ($100 \mu\text{L}$) eta V_i kubetak duen bolumen totala (2 mL). $t=20 \text{ min}$ izango da (erreakzio denbora). Aktibitate entzimatiakoaren unitate bat aurretik azaldutako baldintzetan $1 \mu\text{mol}$ p-nitrophenol-en aurrean minutu batean askatutako entzima kantitatea da. Beraz (29) ekuazioa honela geratuko da:

$$A(U / \text{mL}) = \frac{\left(\frac{\Delta Ab}{20 \text{ min}} \right) \left(\frac{2000 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} \right)}{\left(6,64 \cdot 10^3 \text{ mL} / \text{mol} \cdot \text{cm} \right) \left(\text{cm} \right)} \cdot \left(\frac{1U}{10^{-6} \text{ mol} / \text{min}} \right) = 60,1 \cdot \Delta Ab \quad (30)$$

4.9 ESTERASA PROTEINAREN BEREIKETA OPERAZIOA MINTZEN BIDEZKO PROZESUAREN BIDEZ

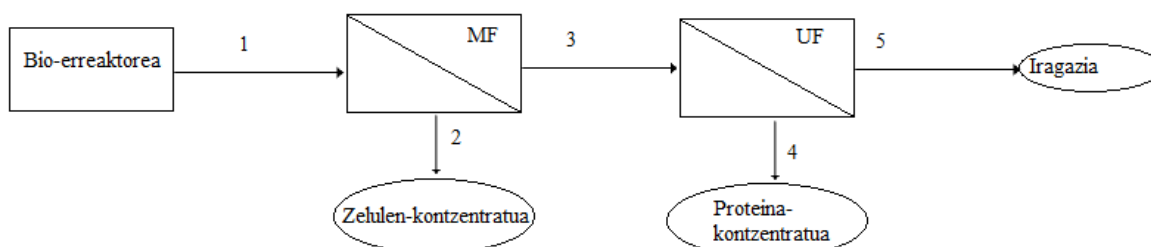
Bio-erreaktorean lortutako proteina errekonbinante extrazelularra berreskuratu egin behar da. Proteina hori aurretik aipatu den bezala *Pseudomona sp.* hazten den esterasa da. Hazkutzak likido bezala 3000 ml erabili dira, eta kantitate ezezaguna den 28 KD -eko proteina bereizi nahi da.

Proteinaren berreskurapen hori mintzen bidezko prozesuen bidez egiten da. Mintzak semi-iragazkorak dira, hau da, espezie batzuei pasatzen uzten die eta beste batzuei bidea oztopatu eta mugatzen die. Horrela, korrantea substantzia batzuetan aberastu eta beste batzuetan pobretu egin dezake. Fluxuen dentsitate aldaketak mintzean zehar sortutako gradiente baten eraginez lortzen dira, gehienetan gradiente horiek presioa, kontzentrazioa edo potentzial elektrikoa izaten direlarik.

Gehienetan presio diferentzian oinarritzen diren mintzak erabiltzen dira, hau da, mikrofiltrazioa (MF), ultrafiltrazioa (UF), nanofiltrazioa (NF) eta alderantzizko osmosia (OI).

Iragazi gabe geratzen diren konposatuei errefusa edo kontzentratua deitzen zaie; mintza iragazten duten konposatuei, aldiz, iragazia.

Praktika honetan mikrofiltrazioa eta ultrafiltrazioa gauzatu dira esterasa kontzentratzeko helburuarekin. Filtrazioa burutzeko sartoflow® Slice 200 Cassetes mintzak erabili dira. Mikrofiltrazioan Hydrosart® $0,2 \mu\text{m}$ mintza erabiliko da zelulak helburuarekin eta ultrafiltrazioan Hydrosart® 5 kDa -ko mintzak esterusak kontzentratzen saiatzeko.



8.Irudia: Mikrofiltrazio eta ultrafiltrazioaren eskema.

Behin banaketa egin ondoren laginak aztertu eta 4.7. eta 4.8. pausak jarraituz, mintzen bidez lortutako eraginkortasuna kalkulatu da.

5 EMAITZEN ANALISIA ETA EZTABAIDA

Lan honetan lortutako emaitzak ondorengo 3 zati nagusitan banatu daitezke:

- Prozesu esperimentalean lortutako emaitzak eta emaitza horren analisia.
- Parametro zinetikoen lorpena prozesu esperimentalean lortutako datuetatik.
- Oxigeno kontsumoaren kalkuluak.

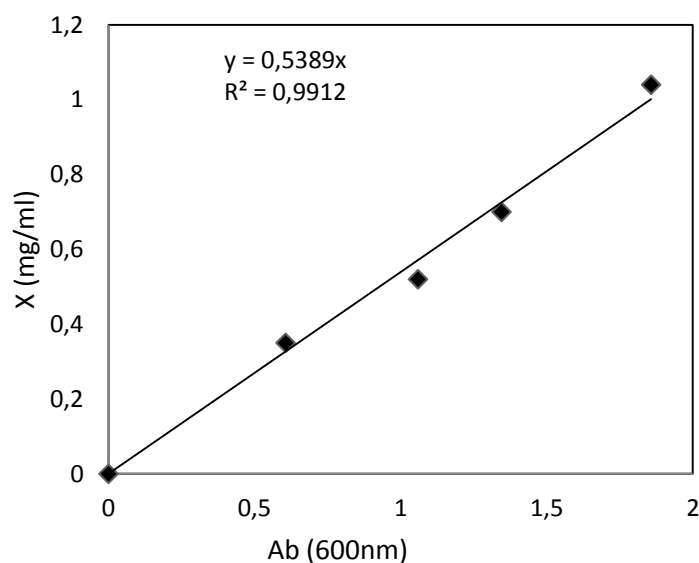
Prozesu esperimentalean lortutako emaitzetan, bio-erreaktorean lortutako balioen azterketaz gain matrazeetako datuen eta banaketa prozesuko emaitzen analisia ere egin da.

5.1 BIO-ERREAKTOREAN LORTUTAKO EMAITZAK

Atal honetan bio-erreaktorean 7 egunez martxan egon den emaitzak jasotzen dira, baita emaitza hauen azterketa ere. Emaitza horrek lortu ahal izateko, aurreko puntuko 4. Prozesu esperimentaleko urratsak jarraitu dira hurrenez hurren.

5.1.1 Biomasa kantitatea

Beharrezko parametro zinetikoak lortzeko, baita erreaktoreko errendimendua jakin ahal izateko, bio-erreaktoreko biomasa kantitatea jakin behar da. Horretarako metodologian aipatutako absorbantzia bidezko metodoa erabili da. 9. Irudian erabilitako patroikurba adierazten da:

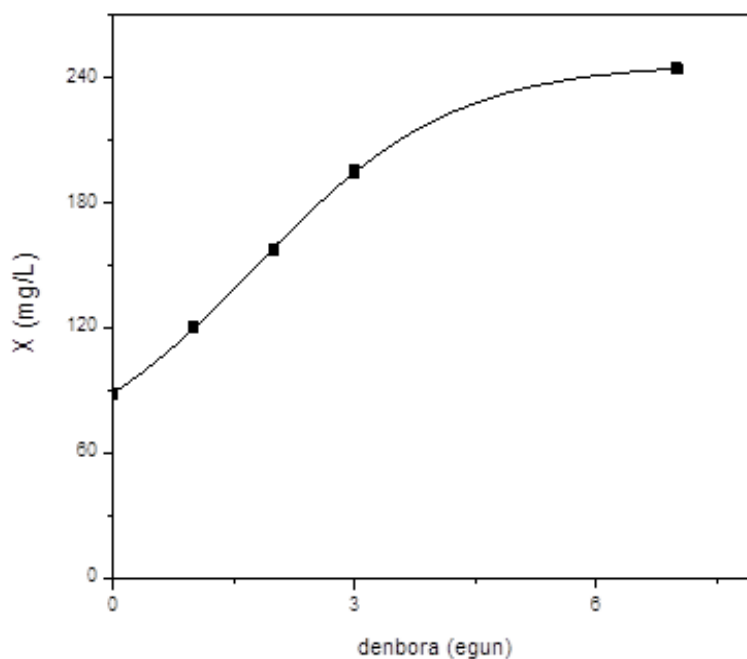


9.Irudia: *Bimasaren lehorraren (mg/ml) doiketa kurba lineala, biomasa lehorraren kontzentrazioa absorbantziaren menpe.*

Ondorengo taulan (5.1. Taula) 7 egunetan zehar lortutako bio-erreaktoreko biomasa lehorraren emaitzak agertzen dira, baita honen adierazpen grafikoa (10.irudia):

5.1.Taula: Bio-erreaktorean denboran zehar lortutako emaitzak.

| t(h) | Ab _{600 nm} | X (mg/L) |
|------|----------------------|----------|
| 0 | 0.163 | 88.08 |
| 24 | 0.274 | 148.06 |
| 48 | 0.291 | 157.25 |
| 72 | 0.36 | 194.53 |
| 168 | 0.451 | 243.70 |

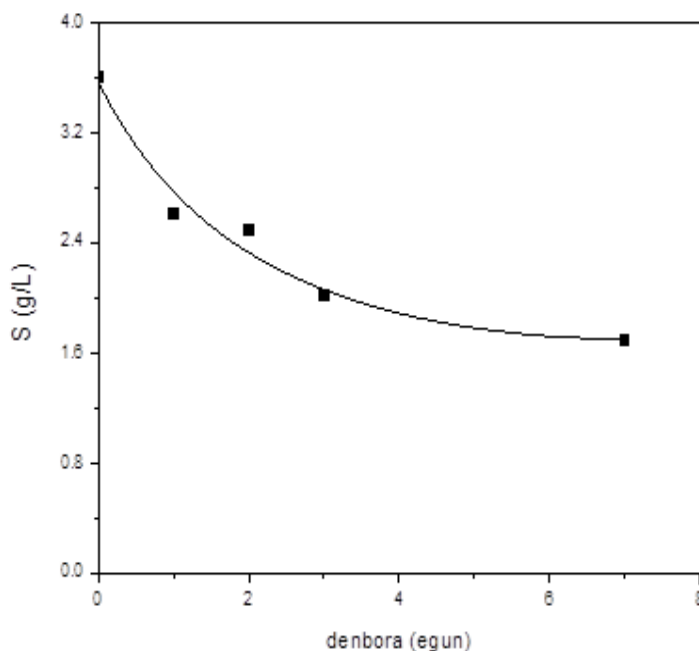


10.Irudia: Bio-erreaktorean lortutako emaitza esperimentalak *Pseudomona putida*-ren kontzentrazioari dagokionez.

10.Irudia aztertuz gero, mikroorganismoaren hazkuntza gertatzen dela beha daiteke. Gainera, Oinarri teorikoan azaldutako 3. Irudiko joera ikus daiteke. Lehenengo bost egunetan mikroorganismoaren hazkuntza esponenzialaren etapa ematen da eta ondorengo 6. egunetik aurrera geldialdi denbora bat nabarmentzen da. Grafiko horren bidez jakin daiteke *Pseudomona putida* ez dela heriotza fasera heldu. Ondorioz, parametro zinetikoak kalkulatzeko orduan heriotzaren koefizientea guztiz baztertuko da.

5.1.2 Glukosaren kontzentrazioa

Metodologian azaldutako *Glucose Liquicolor* metodoa (4.6. glukosa kontzentrazioaren neurketa) erabiliz lortutako emaitzak hurrengo irudikoan adierazten dira. Hauen neurketa egiteko erabilitako laginak eta biomasaren neurketak egiteko erabilitako berdinak izan dira, hau da, une berdinean hartutakoak. 11. Irudian glukosaren kontzentrazioaren jaitsiera nola gertatzen den denboran zehar adierazten da:

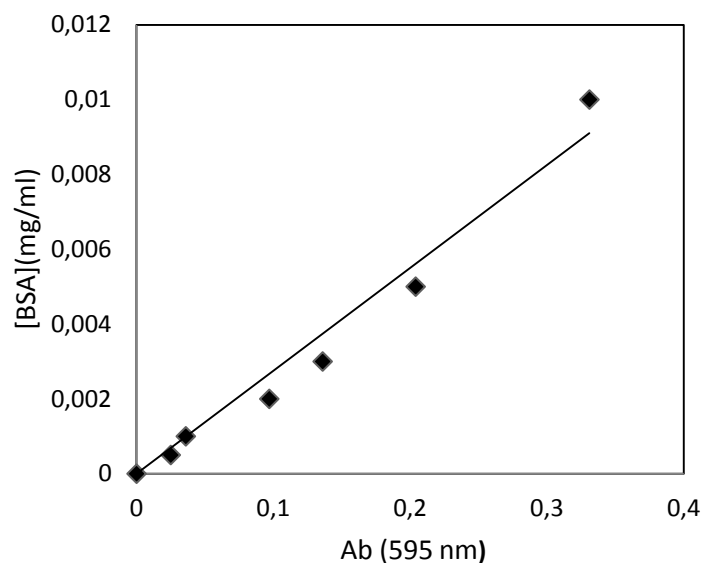


11.Irudia: Bio-erreaktorean lortutako glukosa kontzentrazioak denboran zehar.

10. irudian mikroorganismoaren hazkuntza aztertzen den bezala, 11. Irudi honetan berriz, glukosaren jaitsiera bat agertzen da. Mikroorganismoak hazteko energi iturri bat behar dute, hau da, substratua. Energi iturri hori glukosa da besteak beste. Aipa daiteke erreaktoreko glukosa guztia ez dela kontsumitu. Honen zergatiaren arrazoiak desberdinak izan daitezke, alde batetik inhibizio gertatzea, bestetik, glukosa gehiegi elikatzea erreaktorera edo mugatzailea ez izatea.

5.1.3 Proteina kantitatea

12. Irudian 4.7 Proteina neurketa atalean 4.1. Taulan agertzen den pausuak jarraituz lortutako patroi-kurba erakusten da. Proteina kantitatea patroi kurbaren bidez eta lortutaako abosrbantzien balioak kurba horretan estropolatuz zehaztu da.

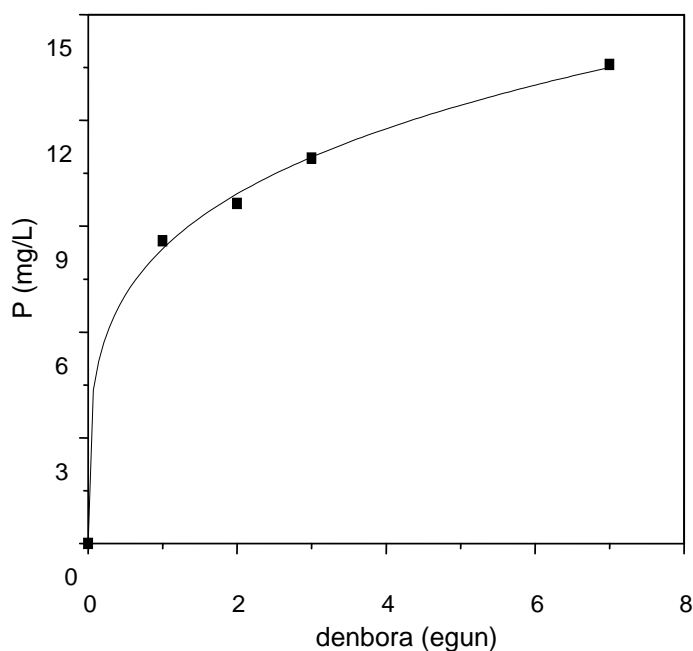


12.Irudia: *Proteinaren patroi-kurba.*

7 egunetan lortutako proteina kantitatea neurtu da eta emaitzak ondorengo 5.2. taulan eta 13.Irudian agertzen dira:

5.2.Taula: *Bio-erreaktorean denboran zehar lortutako proteinaren kontzentrazio emaitzak.*

| t(h) | Ab _{595 nm} | Proteina (mg/L) |
|------|----------------------|-----------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 24 | 0.153 | 85.83 |
| 48 | 0.172 | 96.46 |
| 72 | 0.195 | 109.32 |
| 168 | 0.243 | 135.88 |



13.Irudia: *Bio-erreaktorean lortutako proteina kontzentrazioak.*

Proteina (produktuaren) hazkuntza nabarmena ageri da 13. Irudian. Proteina kantitate gehiena 7. egunean ematen da, hala ere, hazkuntza gehiena lehenengo egunean gertatzen dela ikus daiteke, baita 1. egunetik 7. egunera lortutako proteina hazkuntza motelagoa dela. Beraz, proteina nahikoa dagoela frogatu da, baina orain lortutako proteina horren aktibitatea zenbatekoa den jakin beharko da, benetan lortutako produktua interesgarria den edo ez jakiteko, aktibitatea ahalik eta altuena izatea baita helburua. Aktibitate horren emaitzak ondorengo atalean azalduko dira hurrenez hurren.

5.1.4 Esterasaren aktibitate entzimatikoa eta aktibitate espezifikoa

Aktibitate entzimatikoa lortzeko 4.8. entzimaren aktibitatearen neurketa ataleko pausuak jarraitu beharko dira. Horretarako (30) ekuazioa erabili da, eta aurreko ataleko proteina kontzentrazioa jakinda aktibitate espezifikoa kalkulatu da. 5.3. Taulan azaltzen dira emaitza guztiak.

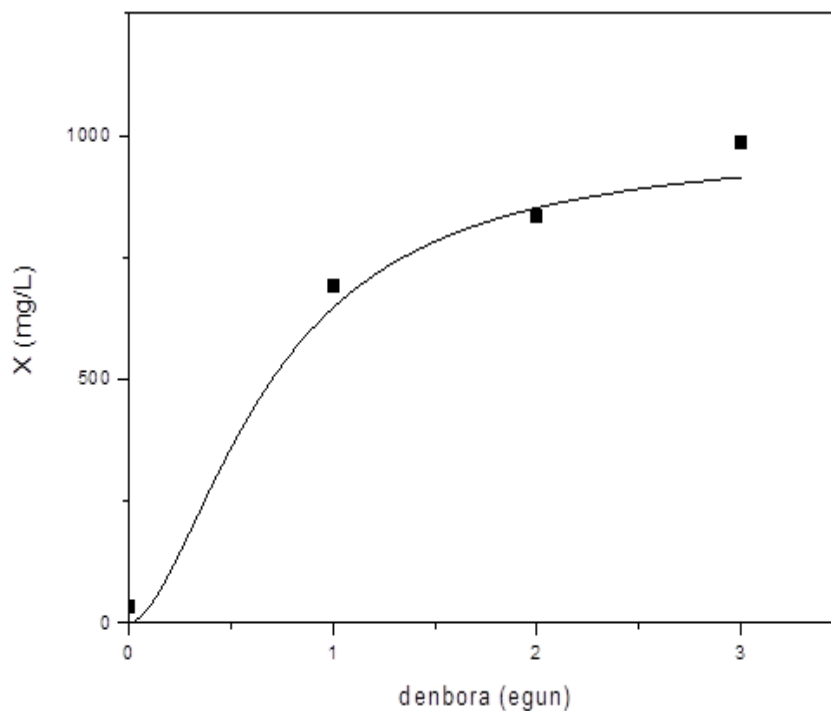
5.3.Taula: *Bio-erreaktorean denboran zehar lortutako aktibitate entzimatikoa eta aktibitate espezifikoa.*

| t (h) | Proteina (mg/L) | A (U/mL) | Akt. Espezifikoa (U/mg) |
|-------|-----------------|----------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 85.83 | 10.457 | 122 |
| 48 | 96.46 | 12.921 | 134 |
| 72 | 109.32 | 15.745 | 144 |
| 168 | 135.88 | 12.200 | 90 |

Lehenengo 24 orduetan proteina kantitate gehiena lortzen da, baita aktibitate entzimatikoa gehiena ere. Ondorengo egunetan hazkuntza bat ikusten da, baina handiagotze hori ez da lehenengo eguneko bezain handia, proteina kantitatearekin gertatzen zen bezala. Gainera, aktibitate espezifikoa eta aktibitate entzimatikoa altuenak 3. egunetan ematen dira (72 h). 7 egunerako jaitsiera bat ematen da. Proteina gehiena berriz 7. egunetan lortzen zen. Helburua aktibitate altuko entzima bat lortzea izango balitz, 3. eguneko hartidurarekin nahikoa izango litzateke.

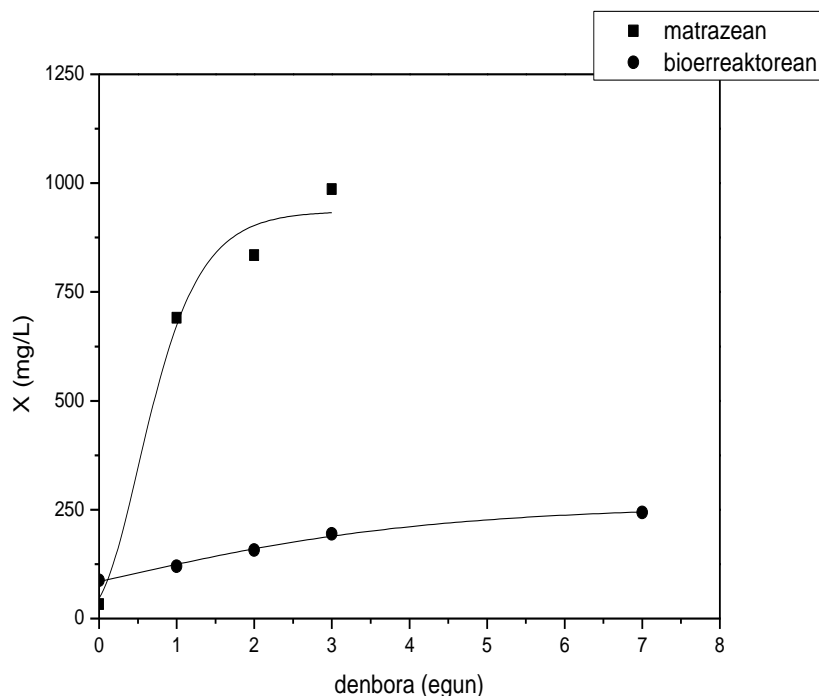
5.2 MATRAZAEETAN LORTUTAKO EMAITZAK

Mikroorganismoaren hazkuntza bio-erreaktorean aztertzeaz gain, 8 matrazetan ere hartidura burutu da mikroorganismoaren hazkuntza bi baldintzetan konparatu ahal izateko. Lortutako emaitzak 4.1. Biomasa kontzentrazioaren neurketa atalean azaldutako pausoak jarraituz egin da. Matrazeetako hazkuntza 8 matrazeetan burutu arren, 14. Irudian emaitza horietatik lortutako batzuek balioak irudikatu dira:



14.Irudia: Matrazeetako hazkuntza zelularra

Argi ikusten da mikroorganismoaren hazkuntza gehiena lehenengo egunean ematen dela. Ondorengo egunetan hazkuntza abiadura hori motelagoa da, hala ere, mikroorganismoa 986 mg/L-arte hazten da. Matrazeetako hazkuntza zelularra 3 egunetan bakarrik aztertu ahal izan da, baina lortutako emaitza horrek bio-erreaktorean lortutakoekin konparatuz gero, askoz gehiago hazi dela matrazeetan bio-erreaktorean baino ikus daiteke, 4 aldiz gehiago hain zuzen ere. Ondorengo 15. Irudian bi baldintza desberdinak irudikatu nahi izan dira desberdintasun nabarmen hau hobeto ikusteko.



15.Irudia: Bio-erreaktoreko eta matrazeko hazkuntza zelularren konparaketa denboraren menpe.

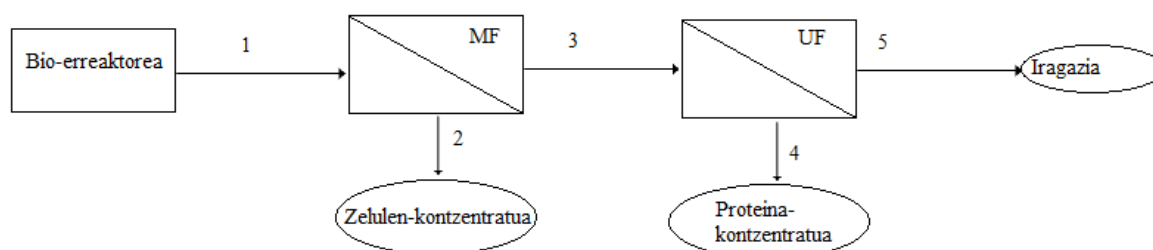
Ez dago argi zein den horrelako desberdintasun handia egotearen arrazoia. Suposatutako arrazoen artean oxigenazioa, irabiaketa eta aparraren kontrako produktu egokia ez erabiltzea izan dira. Oxigenoari dagokionez, bio-erreaktoreko oxigenoaren emaria 1 l/min-ean mantentzen saiatu arren ez da oso segurua benetan zenbat sartzen zen jakitea. Bestetik, irabiaketa izan daiteke arazoa, bio-erreaktorean irabiaketa 250 rpm-tan 3 litro hazkuntza-likido irabiatzeko programatu zen, turbinadun disko baten bidez. Matrazeetan, berriz, irabiaketa hau inkubagailu orbital batean 120 rpm 100 ml-tarako programatu zen. Azkenik, erreaktorean sortutako aparra ekiditeko erabilitako produktu egokia ez erabiltzea hazkuntza desberdintasun honen arrazoi izan daiteke. 2. egunetik 3. egunera bitartean nahikoa apar kantitate gogoangarri sortu zen bio-erreaktoreko goialdean honek hazkuntza zelularrean oztupo bat eraginez.

5.3 ESTERASA PROTEINAREN BEREIZKETA OPERAZIOA MINTZEN BIDEZKO PROZESUAREN BIDEZ

Bio-erreaktorean hartidura egin hoztean, entzima kontzentratu eta hartidura-likidotik banandu beharko da. Horretarako, mintzen bidezko banaketa burutuko da. Lehenik eta behin mikrofiltrazio bidez, eta, ondoren, ultrafiltrazio bidez. Metodologiako 4.9. atalean azaldu den bezala, mintzek duten eraginkortasuna neurtzeko uhertasunaren bidezko metodoa erabiliko da ondoren proteina eta aktibitate entzimatikoa kalkulatzeko. Lortutako balioei esker, aktibitate espezifikoak kalkulatu da. Azkenik, bolumena eta proteina kantitatea jakina denez, mintz horien eraginkortasuna kalkulatu da.

5.4.Taula: Purifikazio prozesuan lortutako emaitzak.

| | lagina | Bolumen totala (ml) | Proteina (mg/L) | A (U/mL) | Akt. Espezifikoa (U/mg) |
|---|-----------------------------|---------------------|-----------------|----------|-------------------------|
| 1 | Bio-erreaktoea (t=168 h) | 3000 | 136 | 12.20 | 90 |
| 2 | Zelula-kontzentratua | 700 | 291 | 18.69 | 64 |
| 3 | Iragazia (mikrofiltrazioan) | 2300 | 90 | 10.22 | 113 |
| 4 | Proteina-kontzentratua | 600 | 229 | 17.13 | 75 |
| 5 | Iragazia (ultrafiltrazioa) | 1700 | 40 | 11.24 | 283 |

**16.Irudia:** Filtrazio prozesuaren bloke diagrama.

Lortutako emaitzak 5.4. Taulan agertzen direnak izan dira. Emaitza horrek aztertuz gero, Iragaziaren aktibitate entzimatiakoaren balioak (11,24 U/mL) zentzurik ez duela ikus daiteke, ezinezkoa delako aktibitate entzimatiakoa mintzean sartzen dena baino handiagoa izatea.

Horregatik ultrafiltrazioan lortutako aktibitate entzimatiakoaren balioak materia balantzean bidez eta aktibitate espezifikoa 4. eta 5. puntuan 3. puntuaren berdina izaten jarraitzen duela kontutan hartuz egin dira kalkuluak. Proteina kontzentratuaren aktibitate entzimatiakoa 25,87 U/mg-ko eta iragazia 4,5 U/mg-ko dela suposatuko da hemendik aurrerako kalkulu guztietan.

Beraz, 5.4. Taula materia balantzean bidez lortutako datuekin ordezkaturik gero, honako eraginkortasunak lortuko dira:

5.5. Taula: Banaketa prozesuan lortutako emaitzak: Proteina, aktibitate entzimatiakoa eta eraginkortasuna.

| | lagina | Proteina (mg) | A (U) | Eraginkortasuna (%) |
|---|-----------------------------|---------------|-------------------|---------------------|
| 1 | Bio-erreaktoea (t=168 h) | 407.64 | $3.66 \cdot 10^4$ | 100 |
| 2 | Zelula-kontzentratua | 203.54 | $1.31 \cdot 10^4$ | 35.74 |
| 3 | Iragazia (mikrofiltrazioan) | 207.06 | $2.35 \cdot 10^4$ | 64.20 |
| 4 | Proteina-kontzentratua | 137.22 | $1.55 \cdot 10^4$ | 65.95 |
| 5 | Iragazia (ultrafiltrazioa) | 67.49 | $0.8 \cdot 10^4$ | 34.04 |

Erreaktoretik irteten den aktibitate entzimatikoa $3,66 \cdot 10^4$ U-koa da. Lehenengo mikrofiltrazio bidez iragazten da, mintz honen helburua zelulak alde baten uztea eta entzimak (intereseko produktuak) aurrera jarraitzea da, mintz horren zuloak nahiko handiak dira entzimak iragazteko, baina ez zelulak pasarazteko. Eraginkortasunak aztertuz gero, mikrofiltrazio mintza hasieran dauden proteinen (aktibitate entzimatiakoaren) % 64,2-ak zeharkatzea lortzen du, eta beste %35-a zelulekin batera kontzentratuan geratzen da. Aktibitate entzimatikoa gehienak zeharkatu harren, kopuru handi bat zelulekin batera galdu da.

Ondoren, ultrafiltrazio prozesura, $2,35 \cdot 10^4$ unitate sartzen dira. Mintz hau 5KD-koa da eta intereseko entzima 28 KD-ekoa. Horregatik, intereseko entzimak ezingo du mintza zeharkatu eta kontzentratu bezala geratu beharko da. Hala ere, aktibitate entzimatiakoaren azterketa egin eta gero, eta eraginkortasunak aztertuz, ultrafiltraziora sartzen den % 65,95-a kontzentratu egiten da eta %34,05 mintz hori iragazten du. Ondorio bezala, mintz hau zeharkatzea lortu duten entzima kantitatea esperotakoa baino txikiagoa izan da, nahiz eta kantitate gehiena iragazi gabe geratu.

Beraz, hasieran prozesura sartzen diren $3,66 \cdot 10^4$ U aktibitate entzimatikotik %42,4 bakarrik lortu da berreskuratzea, erdia baino gutxiago. Beste guztia zelula kontzentratuarekin edo ultrafiltrazioko iragaziarekin galtzen da.

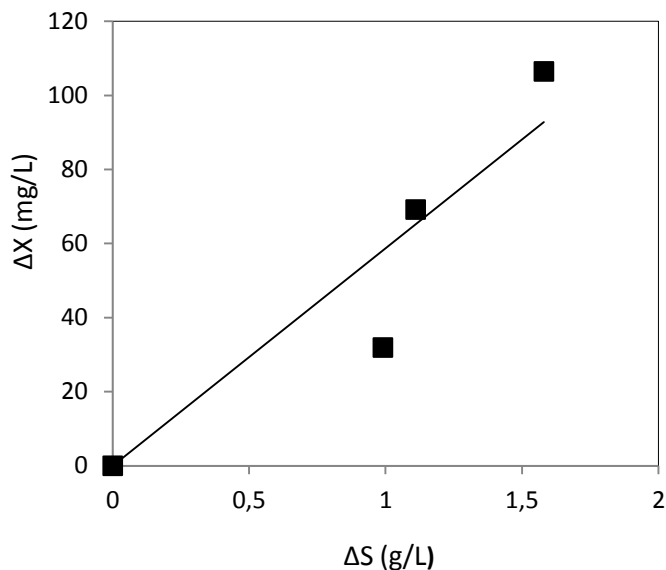
Hau guztia ikusita, banaketa prozesu hau egokia ez izatea, eta beste mintz batzuekin edo beste banatze operazio baten bidez prozesua aztertzea proposatzen da. Operazio baldintza desberdinetan edo mintz selektiboagoak erabiliz.

5.4 PARAMETRO ZINETIKOEN LORPENA

Parametro zinetikoen lorpena oinarri teorikoan azaldutako Monod-en ekuazioan oinarritu da, baita atal horretan azaldutako metodo diferentzial eta integraletan ere.

5.4.1 Etekin faktoreak

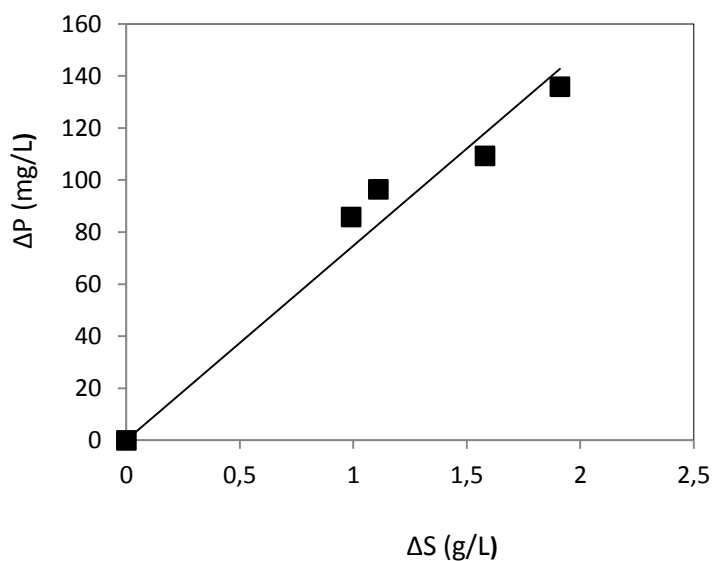
Lehendabizi substratu-mikroorganismoaren etekin faktorea kalkulatu da, aurrerago datu hau erabili behar izango delako glukosa gramo batetik zenbat mikroorganismo lortzen diren jakiteko.



17. Irudia: Etekin faktorea lortzeko mikroorganismo kantitatearen balioa substraturen kontzentrazioarekiko irudikatuta.

Mikroorganismoaren kontzentrazioa glukosa kontzentrazioarekiko irudikatuz gero, linealizazioaren bidez lortzen den malda etekin faktorea izango da. Lortutako balioa 58,74 mikroorganismo mg/glukosa g izan da. Honek esan nahi duena da 58,74 mg mikroorganismo (*Pseudomna putida*) lortzeko 1 gramo glukosa kontsumitu beharko dela. Iturri bibliografikoetan lortutako beste balio batzuekin konparatuz gero (Bailey, 1986), $Y_{xs}=0,38$ mikroorganismo gramo glukosa gramoko, oso balio txikia da, hau da, substratuaren zati handi batek biomasa ez den beste produkturen bat emateko erreakzionatzen du.

Produktuak duen etekina ere kalkulatu da, eta horretarako aurreko grafikoaren prozesu berdina jarraitu da:



18. Irudia: Produktuarekiko etekin faktorea lortzeko mikroorganismo kantitatearen balioa proteinaren kontzentrazioarekiko irudikatuta.

Lortutako etekina 74,7 produktu mg/glukosa g-ko izan da. Hau da, 74,7 mg produktu lortzeko 1 gramo glukosa kontsumitu beharko dela.

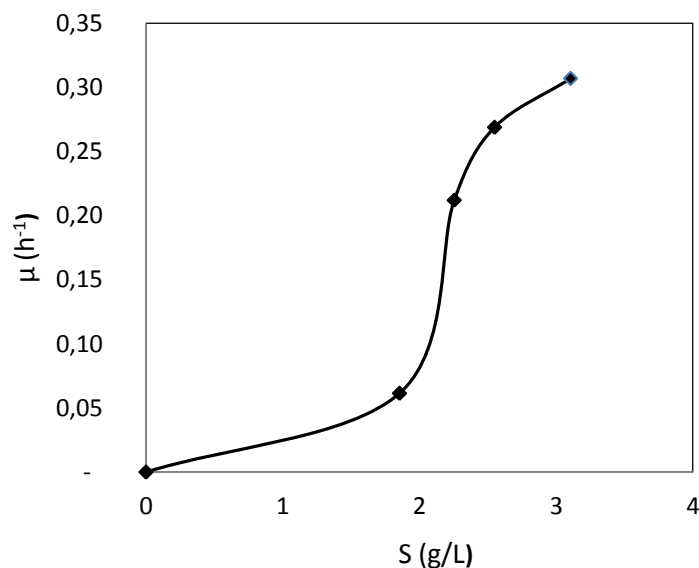
5.4.2 Metodo diferentziala

Metodo diferentzialerako oinarri teorikoko 3.2.2. Parametroen estimazioa atalean azaldutako pausoak eta ekuazioak erabili dira. Bio-erreaktorean lortutako datuetatik abiatuz, lehendabizi diferentziala ($\Delta X/\Delta t$) era numerikoki kalkulatu da, behin diferentziala kalkulatu, (5) ekuaziotik μ askatuta eta honen balioa kalkulatu da. Azkenik, linealizazioaren bidez $1/S$ eta $1/\mu$ -ren balioak kalkulatu dira parametro zinetikoak lortzeko. Ondorengo 5.6. Taulan balio guztiak ageri dira.

5.6. Taula: Metodo diferentzialaren bidez parametro zinetikoak lortzeko beharrezko balioak.

| Denbora | X | S | $\Delta x/\Delta t$ | μ | \bar{S} |
|---------|--------|------|---------------------|--------------------|-----------|
| egun | mg/L | g/L | mg/L·egun | egun ⁻¹ | g/L |
| 0 | 88.08 | 3.60 | 31.92 | 0.31 | 3.105 |
| 1 | 120.00 | 2.61 | 37.25 | 0.27 | 2.55 |
| 2 | 157.25 | 2.49 | 37.29 | 0.21 | 2.255 |
| 3 | 194.53 | 2.02 | 13.62 | 0.06 | 1.855 |
| 7 | 249.00 | 1.69 | | | |

Monod-en ekuazioa irudikatuz gero, ondorengo 15. Irudian ikusten den grafikoa lortzen da.



19. Irudia: Monod-en irudikapen grafikoa, abiadura espezifikoaren substratuaren kontzentrazioarekiko.

Irudi hau aztertuz gero “S” itxura duela ikus daiteke, beraz ez du Monod-en adierazpen teorikoa azaltzen. Hori dela eta aktibazioa dagoela suposatzen da. Beraz, parametroak kalkulatzeko orduan Monod-en ekuazio orokortua (3) erabili beharko da.

Parametro zinetikoak kalkulatzeko orduan eta linealizazioa egitean lortutako balioak ez ziren logikoak (balio negatiboak). Beraz, metodo diferentziala alde batera utzi eta metodo integralarekin lan egingo da.

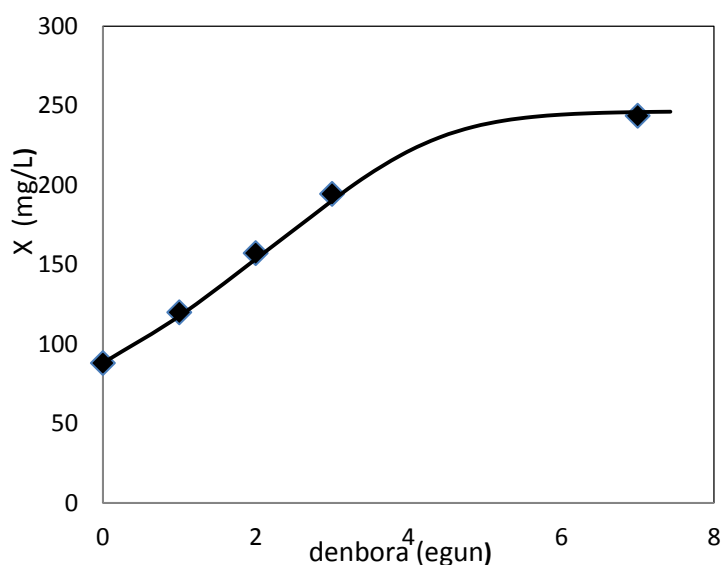
5.4.3 Metodo integrala

Metodo integrala oinarri teorikoko 3.2.2. Parametroen estimazioan azaldutako pausoak eta ekuazioak erabili dira. Bio-erreaktorean lortutako datuetatik abiatuz eta (11) ekuazioa erabiliz, μ_m eta K_S -ren balioak lortu dira, eta horrela, gure datuetara egokien doitzen zen kurba lortu da. Balioak doitzeko orduan erreferentzi gisa μ_m eta K_S -ren definizioak erabili behar izan dira. Hauek dira lortutako balioak:

$$\mu_m^* = 0,44 \text{ egun}^{-1} \quad (31)$$

$$K_S^* = 1,70 \frac{\text{g}}{\text{L}} \quad (32)$$

Parametro horrek Monod-en ekuazio integratuan (11) sartuz gero 20. Irudiko adierazpen grafikoa lortuko da:



20. Irudia: Metodo integral bidez eta doiketaren bidez egokien doitzen diren parametro zinetikoak mikroorganismoaren hazkuntza abiadurari.

Lortutako parametro horiek oso ondo doitzen dira mikroorganismoak denboran zehar duen joerari 20. Irudian ikus daitekeen bezala. Ordea, doiketa hori ez da horren ona izan glukosaren kasurako.

5.5 OXIGENOAREN TRANSFERENTZIAREN ERAGINA

Laborategian aztertutako *Pseudomona putida*-ren hartzidura aerobioa denez, elikagaiez gain oxigenoarekin ere elikatu behar zaio (aireazioa). Oxigenoa elikatzeagatik, oxigenoaren materia transferentziak erreakzio abiadura muga dezake. Horregatik, prozesu honetako erreakzio abiaduraren mugatzailea erreakzio biokimikoa edo materia transferentzia den aztertuko da.

Azterketa hau 3.4 Oxigenoaren transferentzia atalean azaldutako oinarri teorikoan oinarrituko da. Lehenengo materia transferentzia koefizientea kalkulatu da ondoren erreakzio hazkuntza abiadura maximoaren balioarekin konparatzeko. 5.7. Taulan transferentzi koefizientea lortzeko beharrezko parametro guztiak agertzen dira.

5.7. Taula: *Transferentzia koefizientea lortzeko beharrezko parametro guztiak.*

| Parametroak (unitateak) | Balio numerikoa |
|--|----------------------|
| H (mm) | 550 |
| D_T (mm) | 370 |
| D_T/D_I | 3 |
| μ_{\max} (egun ⁻¹) | 0.44 |
| K_S (g/L) | 1.70 |
| S_0 (g/L) | 3.6 |
| Y_{xs} (mg _{mikroorganismo} /g _{glukosa}) | 58 |
| ρ (kg/m ³) | 1100 |
| μ (N·s/m ²) | $2.5 \cdot 10^{-3}$ |
| T (°C) | 30 |
| N (rpm) | 250 |
| v_s (m/s) | $1.55 \cdot 10^{-4}$ |

Transferentzi koefiziente lortu ahal izateko, lehenbizi potentziaren balioa jakin behar da. Balio hau Reynolds-en zenbakiaren eta 12. Irudiaren bidez lortuko da.

$$\text{Re} = \frac{N \cdot D_I^2 \rho_L}{\mu_L} \quad (32)$$

Lortutako Reynolds zenbakia goiko ekuazioaren bidez $27 \cdot 10^3$ izan da. Irabiaketa modulua lortzeko 12. Irudiko grafikoa erabili da. Kasu honetan 2. kurba jarraitu da, laborategi bio-erreaktorearen irabiagailu palak mota horretakoak zirelako (disko turbinak). Irabiaketa modulua beraz 4 da.

Behin irabiaketa modulua ezaguna dela, irabiagailuak behar duen potentzia kalkulatu da:

$$P_g = N_p \rho_L N^3 D_I^5 \quad (33)$$

8.98 W behar ditu motoreak irabiagailua mugitu ahal izateko.

Materia transferentziaren koefizientea kalkulatzeko oinarri teorikoan azaldutako korrelazio desberdinak daude, analisi adimentsionalean oinarritutakoak edo errektorearen bolumen unitateko barreiatutako potentziaren funtzioak. Proiektu honetan erabilitako korrelazioa azken hau izan da, eta erabilitako ekuazioa oinarri teorikoan azaldutako (26) izan da. (26) ekuazioako a, b eta c parametroak Van't Riet-enak izan dira eta ondorengo 5.8. Taulan agertzen direnak dira.

5.8. Taula: Van't Riet-en koefizienteak material transferentzia koefiziente kalkulatzeko.

| Parametroak | Balio numerikoa |
|-------------|---------------------|
| C | $2.6 \cdot 10^{-2}$ |
| a | 0.4 |
| b | 0.5 |

Lortutako transferentzi koefizientea ($k_1 a$) (26) ekuazioa erabiliz eta Van't Riet-en erlazioak erabiliz $7.95 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ izan da.

Normalean, substratuaren garraioa zeluletara erreakzio biologikoa bainoa askoz ere azkarrago gertatzen da, horrela konbertsioaren abiadura globala erreakzio zinetikoren (Monod) bidez gidatua dagoelarik. Ordea, materia transferentzia erreakzio abiadurarekiko motela bada, garraio faseak abiadura globala mugatu dezake. Bi prozesuak konparatzeko (garraio fasea eta erreakzio fasea) konstante zinetikoak erabiltzen dira.

Da, Damkhöler-en zenbaki adimentsionala da. Definizioz, erreakzio biologikoaren abiadura maximoa difusio fasearekiko duen fluxu maximoaren arteko erlazioa da. Eraginkortasuna beraz, Da-ren arabera da:

$$Da = \frac{(\mu_m X/Y_{xs})}{k_1 a S_0} \quad (34)$$

Damkhöler-en zenbaki adimentsionalaren bidez erreakzio biokimikoaren eta materia transferentziaren abiadura maximoaren konparaketa egin ahal izango da, eta horrela erabaki zer fase kontrolatzen duen prozesu globala.

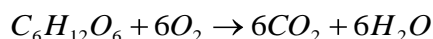
5.9. Taula: Erreakzio abiadura espezifikoa eta oxigenoaren transferentzia koefizientea.

| Parametroak (unitateak) | Balio numerikoa |
|---------------------------|----------------------|
| μ_m, egun^{-1} | 0.44 |
| k_{1a}, s^{-1} | $7.95 \cdot 10^{-3}$ |

Goiko (34) ekuazioan 5.9. Taulako parametroak sartuz gero $6.4 \cdot 10^{-4}$ izango da Damkhöler-en zenbaki adimentsionala. Beraz, erreakzio biokimikoa materia transferentzia baino askoz ere geldoagoa da eta honen arabera, erreakzio biologikoak kontrolatuko du prozesu osoko abiadura globala.

Dagoeneko jakina da erreakzio abiadura erreakzio biokimikoaren bidez kontrolatuta dagoela. Fase esponontzian lortutako hazkuntza abiadura espezifikoa, $0,44 \text{ egun}^{-1}$, oso balio altua da, bereziki oxigeno transferentziaren koefizientearekin konparatzen bada. Gainera, Y_{xs} etekin faktoreak oso balio baxua erakusten du, $Y_{xs}=0.058 \text{ g/g}$. Kasu honetan pentsa daiteke glukosaren zati oso handi bat kontsumitu egiten dela beste azpi-produktu batzuk emateko.

Sartzen den glukosa dena CO_2 -ra oxidatzen dela suposatuz (bai mikroorganismoak elikatzean azpi produktu bezala CO_2 -a kanporatzen duelako, baita errektorearen barruan glukosaren oxidazioagatik askatzen delako):



Erreakzio horretatik lortutako Y_{O_2} balioa $1,066 \text{ g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{glukosa}}$ da. Oxigeno kontsumoaren abiadura (r_{O_2}) hurrengoko ekuazioaren bidez adierazten da:

$$r_{\text{O}_2} = y_{\text{O}_2} \cdot (-dS/dt) \quad (35)$$

Oxigeno transferentziaren abiadura gas fasetik likido fasera hurrengoko adierazpenaren bidez ematen da:

$$r_{\text{O}_2} = k_1 a \cdot (C_{\text{O}_2}^* - C_{\text{O}_2}) \quad (36)$$

5.10 Taulan oxigenoaren kontzentrazioa fase likidoaren hasieran duen balioa agertzen da:

5.10. Taula: Oxigeno kontzentrazioaren balio .

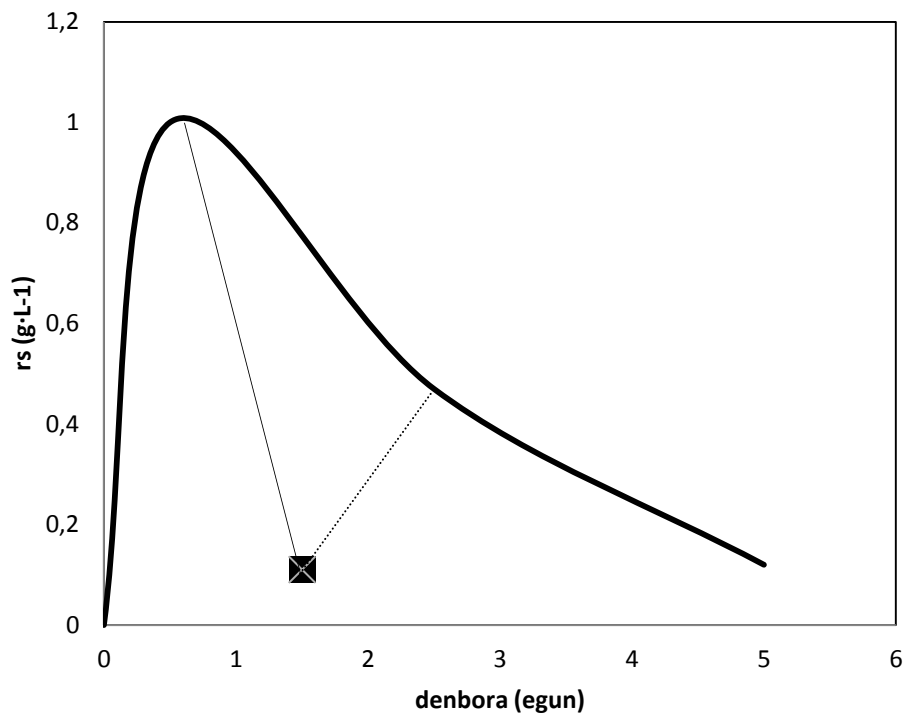
| Parametroak | Balio numerikoa | Iturri bibliografikoa |
|----------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| $C_{O_2}^*$, mg L ⁻¹ | 7.6 | APHA, Standard Methods 1992 |

Balio horrek ezagututa, $k_1 a = 7.95 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ dela jakinda eta aurreko bi ekuazioak berdinduz (egoera egonkorrean) C_{O_2} -ren balioa askatuko da. Ondorengo taulan (5.11. Taulan), balio guztiak agertzen dira:

5.11. Taula: Kontzentrazio diferentzia hartxidura prozesuan zehar.

| <i>Denbora</i> | <i>S</i> | $\Delta S/\Delta t$ | C_{O_2} | ΔC_{O_2} |
|----------------|------------|---------------------|-------------|------------------|
| <i>egun</i> | <i>g/L</i> | <i>g/L·egun</i> | <i>mg/L</i> | <i>mg/L</i> |
| 0 | 3.60 | | | |
| 1 | 2.61 | 1 | 7.550 | 0.049 |
| 2 | 2.49 | 0.11 | 7.594 | 0.005 |
| 3 | 2.02 | 0.47 | 7.577 | 0.023 |
| 7 | 1.69 | 0.12 | 7.594 | 0.006 |

Grafikoki irudikatuz gero, 21. Irudian erakusten den interpretazio grafikoa lortzen da:

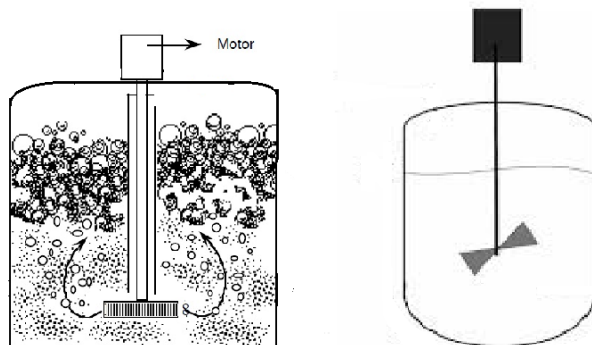


21. Irudia: substratuaren abiadura ($-dS/dt$) denborarekiko duen adierazpena.

21. irudian denboran zehar substratuaren abiadura adierazten da. Lerro jarraituak egoera teorikoa adierazten du eta lerro ez-jarraiak, aldiz, laborategiko hartxidura prozesuan lortzen den emaitza. 1. eta 2. Egunetan substratuaren abiadura jaitsiera nabarmen bat ikus daiteke honen arrazoia prozesuan sortzen den aparra izanik.

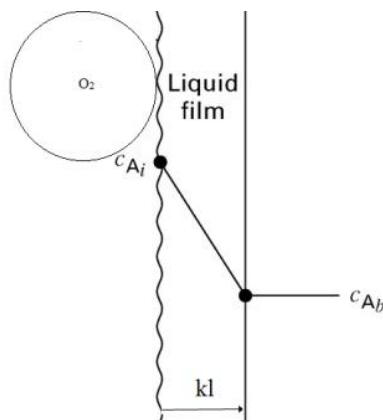
Aireztapen eta agitazio gradu altuek aparraren formazioa eragin dezakete, prozesuan zehar propietate tentsoaktiboak duten molekulak sortzen direlako. Apar honek eragin negatiboak izan dezake oxigeno transferentziaren gain, lehendabizi, burbuilak ekipoa harrapatuta geratzen direlako behin eta berriz errezirkulatuz, erresidentzi denbora handituz eta oxigeno kopurua murriztuz. Horregatik, aparraren formazioa ekidatu beharreko fenomeno da hartxidura prozesuetan, aire hodietako irteerako oztopo bat izateaz aparte, fase likido eta gasaren artean sortutako apar formazioak oxigeno transferentziarako oztopo fisiko oso handia izan daitekeelako hartxidura prozesurako.

Ondorengo 22. Irudian aparra duen erreaktore bat eta aparrik gabeko erreaktore baten irudiak agertzen dira egoeraren grafikoki ikusi ahal izateko.



22. Irudia: Ezkerreko irudia aparra sortu den bio-erreaktore baten irudia da. Eskuineko irudia apparrik gabeko erreaktorea da.

23. Irudian oxigenoaren kontzentrazioak jasaten duen erresistentzia adierazi nahi da:



23.Irudia: Oxigenoaren erresistentzia kontzentrazioen bidez adierazita.

Aurretik aipatu den bezala, $C_{O_2}^* = 7,6$ mg/L da airetik sartzen den oxigenoaren geruzako kontzentrazioa. Oxigeno burbuilak aparra igaro ostean, oxigeno hori “kutsatuta” dagoela esan daiteke eta $C_{O_2}^*$ -ren balioa kontsideratutako balioa baino baxuagoa izango da ($C_{O_2}^*$). Erresistentzia (kl) berdina izaten jarraituko du, beraz kontzentrazio aldaketa ($\Delta C'$) apparrik ez dagoenean baino txikiagoa izango dela esan daiteke. Hau da:

$$\Delta C > \Delta C'$$

5.11. Taulan begiratu gero, argi ikusten da ΔC baliorik handiena hasieran ematen dela eta ondoren balio hau txikitzen joaten dela. Jakina da lehenengo egunean apparrik ez dagoela, horregatik kontzentrazio aldaketarik handiena. Aldiz, ondorengo egunetik aurrera $\Delta C'$ -ren balioa asko murrizten da. Honek esan nahi du bigarren egunean aparra sortu dela eta eragina izan duela sartutako aire burbuilaren kontzentrazioaren gain, bere balioa murriztuz eta ondorioz kontzentrazio aldaketarena ere. Berdina gertatzen da 3. egunetik aurrera. Badirudi momentu batean kontzentrazio aldaketa igo egiten dela, hau da, aparra pixka bat murriztu egin dela, hala ere, ez da lehenengoko balioraino heltzen.

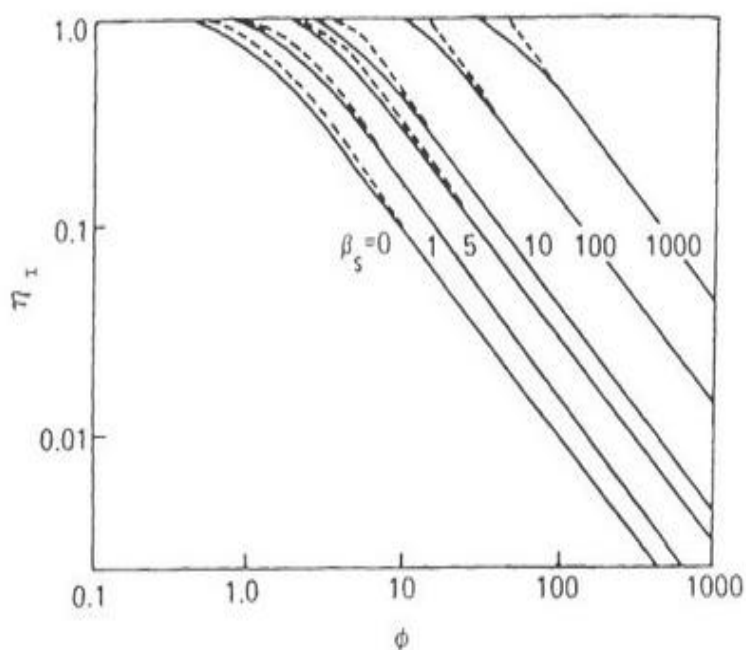
Apar hau ekiditeko helburuarekin apparren kontrako produktua gehitzen zaio prozesuari. Aparren kontrako substantzia hau tentsioaktiboa da, eta transferentzia koefizientearen gainean eragina izan dezake. Gainera, elkarren kontrako bi efektu ditu: alde batetik interfazearen

azalera handitzen du (honek garraioa faboratzen du), bestetik k_1 koefizientearen murrizketa drastiko bat dago (honek oxigeno transferentzia oztopatzen du).

Hau guztia kontutan izanik, pentsa daiteke, prozesuan zehar erabilitako aparraren kontrako produktua (etilengliko %4) ez dela egokiena izan prozesu honetarako, eta ondorengo baterako, aparra kontrako produktu egokia aukeratzeko orduan lehenengo honen inguruko azterketa bat gauzatzea proposatzen da.

Aparrean eragin dezakeen beste faktore bat irabiaketa izan daiteke. Irabiaketa transferentzia hobetzeko helburuarekin gauzatzen da. Irabiaketa potentzia beharrezkoa baino handiagoa bada, prozesua faboratu beharrean mikroorganismoen heriotza eta aparraren formazioa eragin dezake. Horregatik, lan honetan beharrezko potentzia kalkulatu da oxigeno nahikoa egon dadin errektorean irabiaketak aparrean eraginik izan gabe.

250 rpm-tan lortutako Damköhler zenbakia $6.4 \cdot 10^{-4}$ da eta ondorengo 24. Irudia aztertuz gero, Balio horretarako eraginkortasuna (η) 1 dela ikusten da; hau da, prozesuan zehar aztertzen den abiadura eta erreakzio abiadura berdina dela.



24. Irudia: eraginkortasun faktorea Damköhler-en zenbakiaren menpe.

Irabiagailuaren abiadura 250 rpm-tik 25 rpm-ra jaitsiz gero, eta orain arte jarraitutako bide berdina erabiliz, lortzen den transferentzi koefiziente (k_{1a}) $5,05 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ da. 250 rpm-tan lortutako transferentzi koefizientearekin konparatuz ($k_{1a} = 7,95 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) orden bateko aldaketa dagoela ikus daiteke. 25 rpm-tan oxigenoaren transferentzia motelagoa izango da baina (34) ekuazioaren bidez Damköhler-en zenbakia lortuz $Da=0,01$ izaten jarraitzen du. Honek, erreakzio abiadura erreakzio biokimikoaren bidez kontrolatuta egoten jarraitzen duela esan nahi du.

Beraz, ez dago zertan 250 rpm-tan jarri beharrik irabiagailua. Abiadura gutxiagorekin ere prozesuaren abiadura globala erreakzio biokimiko bidez kontrolatuta egoten jarraituko du (25

rpm arte gutxienez) eta gainera, honela aparra eta mikroorganismoen heriotza ekidin ahal izango da oxigeno transferentzia garraio ona izaten mantenduz.

6 ONDORIOAK

Psuedomona putida-ren hartxidura bio-erreaktorean egin ostean, eta hainbat emaitza eta parametroren azterketei esker, hauek dira lortu diren ondoriorik garrantzitsuenak:

Matrazean bio-erreaktorean lortutako mikroorganismo kantitatea baino lau aldiz handiagoa izan da. Hau egitean eskala aldaketa bat dago, eta bioprozesuetan hainbat parametrok eskala aldaketa honetan eragin nabarmena izan dezakete: Geometriak, operazioa aldagaiak, jariakinaren propietateak, garraio prozesuak eta mikroorganismoaren zinetikak. Beraz, eskala aldaketa hau egiteko parametro guzti horrek kontutan izan behar dira.

Eskala aldaketak egitean, errendimendu murrizketa, zinetika aldaketa, esterilizazioan eragina, inokuluan eragina eta homogenizazio arazoak sor daitezke. Beraz, hobekuntza bezala, parametro hauen azterketa egitea, eta zenbaterainoko eragina izan dezakeen faktore bakoitzak aztertzea komeni da.

Eragin izan dezakeen beste faktore bat, bai matrazeetan baita bio-erreaktorean ere, hazkuntza-likidoak oktanoatorik ez izatea izan daiteke. *Pseudomona putida*-rekin lan egin duten beste lan batzuetan (H.Kim-en, 2000) poli(3-hydroxyoctanoato)[P(3HO)]-tan aberastutako hazkuntza-likidoa erabili da zelulak hobeto hazteko. Gure kasuan, oktanoato hau ez da gehitu jakina delako hori gabe despolimerasa entzima ekoizteko gai dela. Hala ere, honen gehikuntzarekin askoz gehiago ekoiztuko zela pentsa daiteke, oktanoatoak entzima honen aktibatzaile lana egingo lukeelako ondoren mcl-PHA despolimerizatzeke.

Esterasaren berreskurapenari dagokionez, nahiz eta mikrofiltrazioan (MF) entzimen aktibitate gehiena mintza zeharkatu eta ultrafiltrazioan mikrofiltraziotik iragazitako entzimen aktibitate gehiena kontzentratuan geratu, prozesu osoko eraginkortasuna aztertzean %42,2-koa dela ikus daiteke. Balio hau oso baxua da, izan ere, iragazketa prozesura sartzen den aktibitate entzimatikoko gehiena bidean galtzen da, bai zelulen kontzentratuarekin baita ultrafiltrazioko iragazian. Horregatik, zelulen kontzentratuan beste banaketa operazio bat gauzatzea (ioi trukaketa, elektroforesia) eta ultrafiltrazioko geruza benetan egokia den edo ez aztertzea eta txikiago batengatik aldatzea proposatzen da. Hortaz gain, prozesu honetako operazio baldintzak (tenperatura, presioa ...) hobeto kontrolatzea ere ondo etorriko litzateke. Pentsa daiteke, entzimaren izaera hidrofobikoa dela eta mintzean harrapatuta geratu dela.

Etekin faktoreari dagokionez, lortutako mikroorganismo gramoak glukosa gramoko oso balio txikia da ($Y_{xs}=58,8$ mg/g). Honen arrazoa aurretik azaldutako oktanoato falta edo baita emaitzen analisi eta eztabaidan aipatutako aparraren arazoa izan daitezke.

Parametro zinetikoen azterketa egitean, metodo diferentzialaren bidez eta Monod-en adierazpen grafikoa irudikatzean, substratuaren bidezko aktibazioa egon dela ikusi da. Honek substratuaren kontzentrazio jakin batera iritsi arte ez dela mikroorganismorik hazten esan nahi du.

Damköhler-en zenbaki adimentsionala aztertuz, prozesuko abiadura globala erreakzio biokimikoagatik mugatuta dago. Hau horrela izanik ere, sortutako apar guztiak eragina du oxigenoaren transferentzian. Transferentzia koefizientean eraginik ez izan arren, oxigeno kontzentrazioa ez da berdina izango aparra zeharkatu ez duen burbuila batean edo aparra zeharkatu duenarentzat. Ondoriozta daiteke, erreakzio abiadura erreakzio biokimikoagatik mugatuta egon arren, erreaktorean sortutako aparrak eragin handia izan dezakeela hartxidura

prozesu batean. Gainera, oxigenoarengan izan dezakeen eraginaz aparte, mikroorganismoak aparrean harrapatuta geratu daitezke euren hazkuntza geldiaraziz.

Apar hori murrizte aldera beste produkturen bat erabiltzea gomendatzen da etilenglikol (%4)-aren ordeztu. Irabiaketak ere (hasira batean transferentzia hobetzeko erabiltzen dena) mikroorganismoen heriotza eta aparraren formazioa sor dezake. 250 rpm-tik 25 rpm-ra irabiaketa abiadura jaitsiz prozesuko abiadura globala erreakzio biokimikoagatik mugatuta jarraitzen duela ikusi da. Hurrengo baterako bio-erreaktoreko irabiaketa abiadura murriztea proposatzen da apar gutxiago sortzeko helburuarekin eta mikroorganismoen hazkuntza optimoagoa lortzeko.

Azkenik, lortutako parametro zinetikoen inguruko azterketa bat eginez gero, 30°C-tan eta pH 7-an dagoen sistema batean, hazkuntza abiadura espezifiko maximoa (0,44 egun⁻¹) beste iturri bibliografikoetan aurkitutakoekin alderatuz (Blanch, 1997) balio askoz ere txikiagoa dela ikusten da. Bere esanahia aztertuz, balioa hain txikia izatearen arrazoi bat substratuarekiko dagoen aktibazioa izan daiteke, aktibazioa egon arte abiadura oso motelean jardungo du erreakzioak eta aktibazioa gertatu ostean erreakzio abiadura hau azkartu egingo delako. Substratuaren konstantearen (K_s) balioa zentzuzkoa da, hau da, abiadura espezifiko bere balioaren erdia denean $K_s=1.70$ g/L izango da. Jakinda 3,6 g/L elikatzen direla, balio hau logikoa da.

7 NOMENKLATURA

| | |
|-------------|--|
| A | Aktibitate entzimatika, $U\ ml^{-1}$ |
| a | Interfasea |
| a | Van't Rief-en koefizienteak |
| Ab | Absorbantzia |
| b | Van't Rief-en koefizienteak |
| BSA | Seroalbumina Bobina |
| C | Kontzentrazioa, $mol\ l^{-1}$ |
| C | Van't Rief-en koefizienteak |
| C_i | i espeziearen kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| C_i^* | i espeziearen kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| C_{ie} | i espeziaren kontzentrazioa erreaktorearen sarreran, $g\ l^{-1}$ |
| C_{is} | i espeziaren kontzentrazioa erreaktorearen irteeran, $g\ l^{-1}$ |
| C_{O_2} | Oxigenoaren kontzentrazioa, $mg\cdot L^{-1}$ |
| $C_{O_2}^*$ | Oxigeno kontzentrazioa, $mg\cdot L^{-1}$ |
| Da | Damkhóler-en zenbaki adimentsionala |
| D_I | Irabiagailuko palen diametroa, m |
| D_T | Bio-erreaktorearen diametroa, m |
| F | Disoluzio faktorea |
| H | Bio-erreaktorearen altuera, m |
| I | Argiaren intentsitatea lagina zeharkatu ondoren, cd |
| I_0 | Argiaren intentsitatea lagina zeharkatu aurretik, cd |
| k_l | Materia transferentzia koefizientea |
| K_S | Monod-en ekuaziaren konstantea, $g\ l^{-1}$ |
| l | Kubetaren luzera, cm |
| MF | Mikrofiltrazioa |
| N | Irabiaketa abiadura, rpm |

| | |
|----------------------|---|
| NF | Nanofiltrazioa |
| N_p | Irabiaketa modulua |
| OI | Osmosia |
| P_g | Irabiagailuaren potentzia, W |
| PHA | 3-hidroxialkanoatoa |
| p-NPO | p-nitrofeniloctanato |
| Q_e | Sarrerako emaria, $l\ h^{-1}$ |
| Q_s | Irteerako emaria, $l\ h^{-1}$ |
| Re | Reynolds-en zenbaki adimentsionala |
| r_i | i espeziearen bio-erreaktoreko hazkuntza abiadura, $g\ l^{-1}\ h^{-1}$ |
| r_{O_2} | Oxigeno kontsumoaren abiadura, $mol\cdot m^3s^{-1}$ |
| r_x | Biomasa hazkuntzaren abiadura globala, $g\ l^{-1}\ h^{-1}$ |
| S | Substratuaren kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| S_0 | Hasierako substratuaren kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| t | Denbora, s |
| T | Tenperatura, °C |
| UF | Ultrafiltrazioa |
| V | Bio-erreaktoreko bolumena, l |
| V_m | Estraktu entzimatico laginaren bolumena, ml |
| v_s | airearen gainazaleko abiadura, $m\cdot s^{-1}$ |
| V_t | kubetaren bolumena, ml |
| X | Biomasa kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| X_0 | Hasierako biomasaren kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| X_e | Sarrerako korronteko biomasaren kontzentrazioa, $g\ l^{-1}$ |
| Y_{O_2} | substratuak duen eraginkortasuna kontsumitutako oxigenoarekiko, $g_s\cdot g_{O_2}^{-1}$ |
| Y_{xs} | Etekin faktorea, $g_x\cdot g_s^{-1}$ |
| ΔAb_{lagina} | Laginaren absorbantzia 600 nm-tan |

| | |
|----------------------|--|
| $\Delta A_{b_{std}}$ | Estandarraren absorbantzia 600 nm-tan |
| η_e | Eraginkortasun faktorea |
| μ | Biskositatea, N s m ⁻² |
| μ | Hazkuntza abiadura espezifiko, h ⁻¹ |
| μ_m | Hazkuntza abiadura espezifiko maximoa, h ⁻¹ |
| ρ | Dentsitatea, kg m ⁻³ |

8 BIBLIOGRAFIA:

Bailey, J., Ollis, D., 1986. Biochemical Engineering fundamentals. McGraw-Hill Education, 2nd ed.

Blanch, H., Clark, D., 1997. Biochemical Engineering. CRC Press, 2nd ed.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal biochem.* 72, 248-254.

Diaz Fernandez, J.M., 2012. Ingeniería de bioprocesos. Editorial Paraninfo, 10. kapituluua. Transferencia de materia. Suministro de oxígeno.

Doran, P.M., 1998. Principios de Ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia, S:A:, 1. edizioa.

Duarte, A..Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

Gangoiti, J., Santos, M., Prieto, M.A., de la Mata, I., Serra, J.L., Llama, M.J., 2012. Characterization of a Novel Subgroup of Extracellular Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from Antinobacteria. *AEM Journals.* 78, 20, 7229-7237.

Godia, F., López, J., (eds), 2005. Ingeniería Bioquímica. Editorial Sintesis. 4,6 eta 7 kapituluak.

Gómez Romero, S.E., Gutiérrez Bustos, D.C., Hernández Marín, A.M., Hernández Rodríguez, C.Z., Losada Casallas, M., Mantillas Vargas, P.C., 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Publicación científica en Ciencias Biomédicas, 6, 9, 101-112.

HUMAN diagnostics manual. Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH" Glucose liquicolor.

Jean, Y.C., Huang, Y.S., Chao, C.S., Jiang, J.H., Tseng, C.C., 2005. Stereoselective Esterase from *Pseudomonas putida* IFO 12996 Reveals α/β Hydrolase Folds for D- β Acetylthioisobutyric Acid Synthesis. *J Bacteriol.* 187 (24), 8470-8476.

Levenspiel, O., 1999. Chemical Reaction Engineering. John Wiley & Sons. 5. kapituluua. Biochemical Reaction systems. 609-654 orr.

McNeil, B., Harvey, L.M, 1990. Fermentation, a practical approach. Oxford University. 4 eta 6 kapituluak.

Bacteriología. Fisiología Bacteriana, Medidad del crecimiento (Mayo 2015): <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?Mostrar=medida>