

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Ingeniería Química

**Cinética de Reacciones
Enzimáticas Controladas por la
Transferencia de Oxígeno**

TESIS DOCTORAL

Gabriel Blázquez García

Marzo, 1991



01534040

T
14
55

UNIVERSIDAD DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 15 MAR. 1991
ENTRADA NUM. 2222

Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

CINETICA DE REACCIONES ENZIMATICAS

CONTROLADAS POR LA TRANSFERENCIA DE OXIGENO

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 619663900
Nº Copia 121213203

GABRIEL BLAZQUEZ GARCIA

MARZO, 1991

UNIVERSIDAD DE GRANADA
15 MAR. 1991
619663900

CINETICA DE REACCIONES ENZIMATICAS CONTROLADAS POR LA TRANSFERENCIA DE OXIGENO.

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas), dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Tecnología Bioquímica y Agroalimentaria" (Bienio 1986-88).



Granada, 12 de Febrero de 1991

Fdo.: Gabriel Blázquez García

FERNANDO CAMACHO RUBIO, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre.

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Cinética de reacciones enzimáticas controladas por la transferencia de oxígeno", ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento desde Enero de 1987 hasta el momento por el Licenciado D. Gabriel Blázquez García, bajo mi dirección y la de la Dr^a. Maria Purificación Páez Dueñas.

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. D. Fernando Camacho
Rubio
Catedrático de Ingeniería
Química

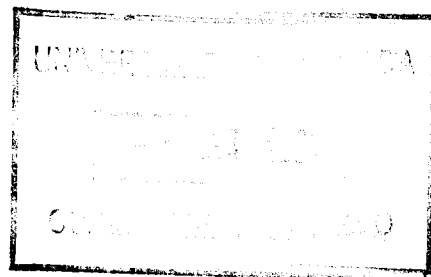
Dr^a. D^a. M^a. Purificación Páez
Dueñas
Profesora Titular de
Ingeniería Química

- A D. Fernando Camacho Rubio y a D^a. M^a. Purificación Páez Dueñas, directores de esta Tesis, por el estímulo, total dedicación y acertada dirección en la realización de la misma.

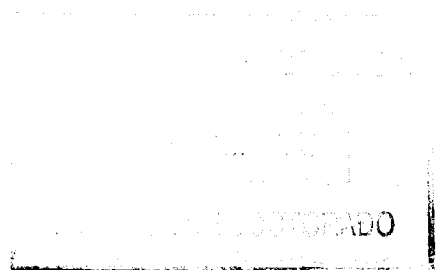
- A D. Mariano de la Paz Gómez Garzón y a D. Antonio Gálvez Borrego por su ayuda inestimable y desinteresada en la confección de algunas de las figuras que aparecen en el presente Trabajo.

- A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, y en definitiva, a todos aquellos que me han ayudado y aconsejado durante la preparación de la presente Memoria, y que por tanto han contribuido de alguna manera, y siempre desinteresadamente, a la realización de la misma.

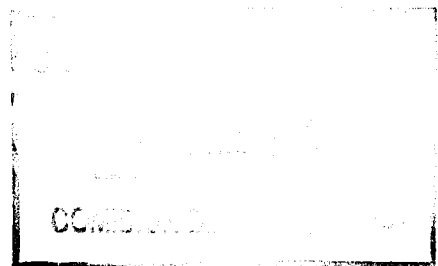
A todos mi más sincero agradecimiento.



a Angeles
a mis padres



0. INDICE



1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	9
2.1. TRANSFERENCIA DE MATERIA GAS-LIQUIDO CON REACCION EN LA FASE LIQUIDA	13
2.1.1. Absorción con reacción química irresversible	16
2.1.2. Aplicación a la cinética hiperbólica	24
2.2. TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN LA FERMENTACION AEROBIA	29
2.2.1. Medida de la capacidad de aireación	30
2.2.2. Aplicación a los fermentadores aerobios	33
2.3. TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN SISTEMAS ENZIMATICOS ...	35
2.3.1. Oxidación de glucosa con oxígeno en presencia de glucosa-oxidasa	36
2.3.2. Otros sistemas enzimáticos	47
2.4. OBJETO DE LA PRESENTE INVESTIGACION	48
3. TECNICAS UTILIZADAS	51
3.1. MATERIALES Y METODOS	53
3.1.1. Productos químicos utilizados	53
3.1.2. Instalación experimental	54
3.1.3. Procedimientos de trabajo	56
3.1.4. Métodos de análisis	60
3.2. CARACTERISTICAS DE LOS ELECTRODOS	65
3.2.1. Dinámica del electrodo de oxígeno	66
3.3. CALCULO DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS	76
3.3.1. Solubilidad del oxígeno en la fase líquida ..	76
3.3.2. Difusividad del oxígeno en la fase líquida ..	85

3.4. DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES VOLUMETRICOS DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO	94
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	109
4.1. OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MEDIANTE GLUCOSA-OXIDASA	111
4.1.1. Influencia de la concentración de glucosa-oxidasa	112
4.1.2. Influencia de la concentración de catalasa ..	112
4.1.3. Influencia de la concentración de glucosa ...	124
4.1.4. Influencia de la composición de la fase gaseosa	124
4.1.5. Influencia de la temperatura	147
4.1.6. Desnaturalización térmica de la glucosa-oxidasa	173
4.2. OXIDACION DE ALANINA CON OXIGENO MEDIANTE D-AMINOACIDO-OXIDASA	173
4.2.1. Influencia de la concentración de D-aminoácido-oxidasa	173
4.2.2. Influencia de la concentración de alanina ...	180
5. DESARROLLO DE MODELOS CINETICOS	185
5.1. Modelos de absorción gas-líquido	188
5.2. Modelos con absorción directa en la interfase	198
5.3. Modelos simplificados para el estado cuasi-estacionario	206
6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	217
6.1. OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA DE GLUCOSA-OXIDASA	219
6.1.1. Influencia de la composición de la fase líquida	219

6.1.2. Influencia de la composición de la fase gaseosa	230
6.1.3. Aplicación del modelo con absorción directa en la interfase	236
6.1.4. Influencia de la temperatura	248
6.2. OXIDACION DE ALANINA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA DE D-AMINOACIDO-OXIDASA	260
7. CONCLUSIONES	267
8. ANEXOS	273
9. NOMENCLATURA	291
10. BIBLIOGRAFIA	297

6.1.2. Influencia de la composición de la fase gaseosa	230
6.1.3. Aplicación del modelo con absorción directa en la interfase	236
6.1.4. Influencia de la temperatura	248
6.2. OXIDACION DE ALANINA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA DE D-AMINOACIDO-OXIDASA	260
7. CONCLUSIONES	267
8. ANEXOS	273
9. NOMENCLATURA	291
10. BIBLIOGRAFIA	297

1. RESUMEN



La escasa solubilidad del oxígeno en las disoluciones acuosas que se utilizan como medios de cultivo, junto con los altos requerimientos de este componente en los procesos de fermentación aerobia para la producción metabólica de energía y para la síntesis de biomasa y productos, determina la necesidad de su suministro continuo en los biorreactores correspondientes, aireación.

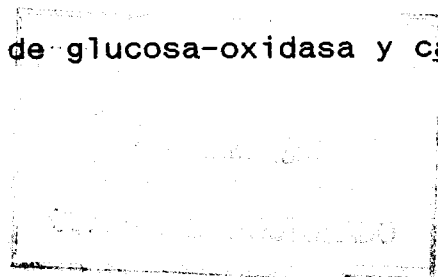
Por otra parte, cuando se alcanzan densidades de biomasa apreciables, la transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa al medio de cultivo suele convertirse en el factor controlante del crecimiento de los microorganismos. Dado que este fenómeno depende de manera importante del grado de mezcla de las fases implicadas y de las condiciones de turbulencia en cada punto del biorreactor, su control de la velocidad global representa la mayor dificultad para el diseño basado en el cambio de escala.

Por estas razones sería conveniente disponer de sistemas biológicos adecuados para comparar los diferentes diseños de biorreactores y métodos de operación.

Estos sistemas biológicos pueden ser reacciones de oxidación con oxígeno molecular catalizadas por enzimas o cultivo de microorganismos aerobios en condiciones de limitación por oxígeno.

En esta Memoria se da cuenta de los resultados obtenidos en el estudio de dos sistemas del primer tipo indicado anteriormente.

- a) Oxidación de glucosa en presencia de glucosa-oxidasa y catalasa.



b) Oxidación de alanina en presencia de D-aminoácido-oxidasa y catalasa.

Para la aplicación de estos sistemas con la finalidad indicada es necesario conocer la cinética de la reacción enzimática que tiene lugar. La determinación de esta cinética requiere el conocimiento lo más exacto posible de la concentración de oxígeno disuelto en el seno de la fase líquida en función de las condiciones de operación. Dado que el método ideal para ello es la utilización de un electrodo de oxígeno que suministra una medida continua de esta variable, se ha puesto a punto un método experimental en el que se trata de minimizar las causas de error en la lectura del electrodo y que permite encontrar las condiciones de limitación por oxígeno en un amplio margen de velocidades de la reacción de oxidación considerada.

El dispositivo experimental utilizado ha consistido en un tanque agitado discontinuo con respecto de la fase líquida y continuo con respecto de la fase gaseosa. El contacto gas-líquido tiene lugar sólo en la superficie interfacial, prácticamente plana, del líquido en el tanque, por lo que se evitan los errores debidos al burbujeo que afecta de forma aleatoria la lectura del electrodo y la necesidad de conocer con precisión el grado de mezcla de la fase gaseosa en el reactor.

Modificando las condiciones de agitación de la fase líquida y su relación superficie/volumen, es posible variar el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, $k_L a$, en un amplio rango: 0,01 a 1 min^{-1} , que unida a la posibilidad de trabajar con oxígeno puro o aire como fase gaseosa, sin resistencia apreciable de esta fase al proceso de transferencia, permite el estudio cinético de reacciones de oxidación con velocidades de consumo de oxígeno comprendidas entre: 10^{-6} y 10^{-3} $\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$.

Los coeficientes volumétricos de transferencia de materia, en las condiciones utilizadas en esta investigación, se determinaron por aplicación del método dinámico en ausencia de las enzimas correspondientes.

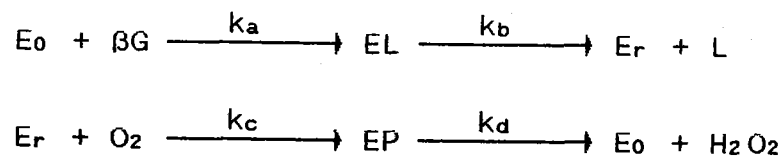
Por otra parte, dado que las concentraciones de los sustratos disueltos en la fase líquida pueden ser considerablemente superiores a estas velocidades de reacción, aunque el dispositivo experimental funciona en estado no estacionario, se alcanza generalmente un estado cuasi-estacionario en el que la variación de la lectura del electrodo es mínima y por tanto despreciable el retraso provocado por el mismo.

Sin embargo, en la interpretación de los experimentos no se han utilizado sólo los datos correspondientes a este estado cuasi-estacionario, sino que se han desarrollado modelos cinéticos teniendo en cuenta la cinética de todos los procesos que tienen lugar, incluido el retraso del electrodo, que han permitido la simulación completa de los experimentos realizados.

En el estudio experimental de la oxidación de glucosa con oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa y catalasa, se ha analizado la influencia de las concentraciones de glucosa-oxidasa, catalasa y glucosa, de la composición de la fase gaseosa y de la temperatura.

El análisis de los resultados obtenidos variando las concentraciones de enzimas y de sustrato, pone de manifiesto que en el caso de la catalasa su acción únicamente afecta a la estequiometría de la reacción global que tiene lugar por descomposición del peróxido de hidrógeno formado como era de esperar, pero incluso en su ausencia el peróxido de hidrógeno formado hasta que se alcanza el estado cuasi-estacionario no es suficiente para afectar negativamente la acción de la glucosa-oxidasa.

La influencia de las concentraciones de glucosa-oxidasa y glucosa son compatibles con el mecanismo



que aplicando la aproximación de estado estacionario para los intermedios en los que interviene la enzima, conduce a la ecuación cinética

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

cuyos parámetros cinéticos se han determinado para las condiciones utilizadas de 25 °C y pH = 5,55.

Sin embargo, un modelo basado en la transferencia de oxígeno gas-líquido seguida de su reacción en el seno de la fase líquida por el mecanismo anteriormente indicado, no permite explicar los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la composición de la fase gaseosa.

La gran influencia de la concentración de oxígeno en la interfase en los resultados obtenidos en estos experimentos, sugiere la existencia de un mecanismo directo de absorción de oxígeno desde la fase gaseosa por las moléculas de enzima adsorbidas en la interfase, mecanismo que ha sido frecuentemente señalado para explicar la cinética de los procesos de fermentación aerobios.

Por esta razón, se modificó el modelo cinético comentado anteriormente para incluir este mecanismo suponiendo diferentes expresiones para el flujo de absorción directo, N_d .a. Mediante la

expresión:

$$N_{d.a} = k_{i.a} [E_r] [O_2]_i [\beta G]$$

en la que el flujo debido a este mecanismo directo es proporcional a las concentraciones de la forma reducida de la enzima y de β -glucosa en el seno de la fase líquida y a la concentración de oxígeno en la interfase, se han podido explicar los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la composición de la fase gaseosa.

En definitiva, el modelo cinético desarrollado en el estudio de la oxidación de glucosa con oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa y catalasa a 25 °C y pH = 5,55, incluye la cinética de los procesos de transferencia de oxígeno gas-líquido, mecanismo directo de absorción desde la fase gaseosa, mutarrota-ción y reacción enzimática en el seno de la fase líquida y el retraso del electrodo. Este modelo reproduce aceptablemente los resultados experimentales, lo que confirma la validez de los pará-metros cinéticos obtenidos y de los mecanismos propuestos.

El estudio de la influencia de la temperatura puso de mani-fiesto que por encima de los 30 °C se produce una desnaturaliza-ción térmica apreciable de la glucosa-oxidasa aunque no de la catalasa. Esta conclusión se confirmó mediante un estudio inde-pendiente de la desnaturalización térmica de la glucosa-oxidasa, utilizando una modificación del método propuesto por Pifferi y colaboradores para la medida de la actividad de la glucosa-oxidasa en unidades internacionales, que permitió establecer que la desnaturalización térmica se produce por una cinética de orden cero y determinar la constante cinética correspondiente en fun-ción de la temperatura.

En el estudio experimental de la oxidación de alanina con oxígeno molecular en presencia de D-aminoácido-oxidasa y catalasa se ha analizado exclusivamente la influencia de las concentraciones de sustrato y enzima, encontrándose que el proceso tiene lugar por un mecanismo semejante al sistema anterior y determinando sus parámetros cinéticos en las condiciones de operación: 39 °C y pH = 7,3.

2. INTRODUCCION



Aunque el estudio experimental y teórico de los procesos químicos gas-líquido ha alcanzado un grado apreciable de desarrollo, los procesos biológicos son considerablemente más complicados y difieren de los sistemas químicos en aspectos esenciales:

- La falta de oxígeno puede determinar no sólo la limitación del crecimiento sino también la pérdida irreversible de viabilidad de las células.
- Los microorganismos son del mismo orden de magnitud que el espesor de las capas límites gas-líquido.
- Los microorganismos tienden generalmente a adsorberse sobre la interfase gas-líquido.
- Los medios de fermentación contienen siempre cantidades apreciables de agentes de superficie, tales como: proteínas y biomoléculas segregadas por las células o liberadas en la lisis de éstas.
- Muchos medios de fermentación de microorganismos filamentosos se comportan como fluidos no newtonianos.
- Frecuentemente los microorganismos se agregan en flóculos de mayor tamaño o se inmovilizan artificialmente sobre soportes sólidos.

Estas diferencias aconsejan llevar a cabo el estudio experimental de la transferencia de oxígeno en sistemas biológicos y no extrapolar conclusiones establecidas utilizando sistemas químicos, como la determinación de la capacidad de

aireación de biorreactores utilizando la oxidación de sulfito catalizado por Co^{++} ; aunque indudablemente los métodos experimentales y los modelos desarrollados en el estudio de los sistemas químicos pueden ser muy útiles para la planificación de los experimentos y la interpretación de los resultados.

Los primeros estudios ingenieriles sobre la transferencia de oxígeno en los procesos de fermentación fueron publicados hace 40 años por Hixson y Gaden (1950) y Bartholomew y col. (1950) que ponen de manifiesto la complejidad del fenómeno y lo descomponen en sus diferentes etapas: transferencia de oxígeno gas-líquido, transferencia de oxígeno líquido-célula y reacción química catalizada por enzimas en el interior de la célula.

Desde entonces los trabajos de investigación publicados han puesto de manifiesto que los diferentes métodos propuestos para la medida de las velocidades de transferencia de oxígeno en sistemas biológicos no permiten una extrapolación sencilla a sistemas distintos de aquellos con que se ponen a punto, probablemente debido al desconocimiento de los mecanismos reales por los que se produce esta transferencia.

Así, para comparar los diferentes diseños de biorreactores y los métodos de operación con el fin de determinar las velocidades de transferencia de oxígeno sería deseable disponer de sistemas modelos para los diferentes tipos de procesos:

- Microorganismos libremente suspendidos.
- Microorganismos agregados en flóculos.
- Microorganismos inmovilizados en partículas dispuestas en un lecho fijo o fluidizado.

Evidentemente sería necesario conocer los requerimientos de nutrientes y la cinética del crecimiento de los microorganismos

utilizados como sistemas modelo ("Biological Test Systems"), Fiechter (1984).

Un paso intermedio en el uso directo de microorganismos es el empleo de reacciones de oxidación, con oxígeno molecular catalizadas por enzimas; además la elevada especificidad de las enzimas pueden permitir cambiar las propiedades físicas de la fase líquida, utilizando diferentes aditivos, con mayor facilidad que en los sistemas químicos.

Las enzimas utilizadas deberán ser oxidorreductasas que utilizan el oxígeno molecular como aceptor de electrones:

- Oxidasas, EC 1.a.3.b.
- Oxigenasas, EC 1.13.a.b ó EC 1.14.a.b.

fundamentalmente aquellas que pueden obtenerse relativamente puras a un precio asequible y que no requieren cofactores.

2.1. TRANSFERENCIA DE MATERIA GAS-LIQUIDO CON REACCION EN LA FASE LIQUIDA

Se consideran en este apartado los sistemas gas-líquido en que un componente A de la fase gaseosa se absorbe en la fase líquida, experimentando una reacción química con un componente B de la misma. El proceso queda representado por las siguientes reacciones



Es evidente que el proceso implica la transferencia de A desde el seno de la fase gaseosa a la interfase, su disolución en

la interfase y la transferencia de ambos reactivos y reacción química simultánea en la fase líquida. Esta última etapa será considerada en primer lugar debido a que incluye dos procesos que ocurren simultáneamente y por tanto que se influyen entre sí.

Es necesario conocer el mecanismo por el que tiene lugar la transferencia de materia en la fase líquida para el tratamiento teórico de estos procesos. En general, los diferentes modelos propuestos se basan en las ecuaciones de difusión, es decir, correspondientes al transporte molecular, sea cualquiera el grado de turbulencia de la fase líquida. El primer modelo de este tipo es la teoría de la película propuesta por Whitman (1923), que supone que toda la resistencia a la transferencia de materia puede considerarse localizada en una película de fluido adyacente a la interfase, a través de la cual el transporte de materia se realiza por difusión en régimen estacionario.

Posteriormente se han propuesto los modelos de la penetración o de renovación superficial, que suponen que en la proximidad de la interfase el transporte de materia tiene lugar por difusión en régimen no estacionario, ya que continuamente se están reemplazando elementos de líquido de la interfase por otros procedentes del seno de la fase líquida y cada uno de ellos permanece en la interfase un tiempo inferior al necesario para que se alcance el perfil de concentraciones correspondientes al régimen estacionario. Este modelo fue propuesto en primer lugar por Higbie (1935) que considera que cada elemento de líquido está expuesto al gas durante el mismo periodo de tiempo, y posteriormente modificado por Danckwerts (1951) introduciendo una distribución al azar de las edades de los elementos de líquido que abandonan la superficie.

Dado que el transporte turbulento tiene características

semejantes al transporte molecular de materia, salvo que se produce por el movimiento al azar de elementos macroscópicos del fluido en lugar de por el de moléculas individuales, se ha propuesto, King (1966), representar su densidad de flujo por la correspondiente al transporte molecular, ley de Fick, introduciendo una difusividad turbulenta, D_T , función potencial de la distancia a la interfase, x :

$$D_T = a_1 x^n + a_2 \quad [2.2]$$

Normalmente se acepta que a_2 debe ser nula o muy pequeña, ya que la tensión superficial del líquido debe atenuar de manera importante la turbulencia en la interfase. De esta manera, Davies (1966), Lamourelle y Sandall (1972), Menez y Sandall (1974) y Camacho y col. (1976, 1977 y 1980), interpretan experimentos de transferencia de materia gas-líquido con y sin reacción química, utilizando en la ecuación [2.2] valores de $a_2 = 0$ y $n = 2$.

Sin embargo, King (1966) interpretando los experimentos de transferencia de materia líquido-sólido de Calderbank y Moo-Yoong (1961), llega a la conclusión de que el valor de n más idóneo es 4. Por otra parte, Linek y col. (1970a y 1970b) determinan en el estudio experimental de la absorción física de varios gases en disoluciones de electrolitos, que al aumentar la fuerza iónica el exponente n aumenta de 2 a 3.

Todos estos métodos implican al menos, el cálculo de un parámetro empírico que debe determinarse a partir de medidas experimentales de la velocidad de transferencia de materia, Tsao y Lee (1977) y Morbidelli y col. (1984); además conducen prácticamente a los mismos resultados, ya que la diferencia más acusada entre ellos reside en la influencia prevista de la

difusividad molecular sobre el coeficiente de transferencia de materia, pero esta magnitud es difícil de determinar con precisión y varía relativamente poco para los distintos gases solubles utilizados, por lo que la distinción entre estos modelos es compleja. De acuerdo con todo lo indicado anteriormente, para analizar la interacción entre la transferencia de materia y la reacción química se utilizará el modelo de la película por ser el de aplicación más sencilla y por tanto el más utilizado.

2.1.1. ABSORCION CON REACCION QUIMICA IRREVERSIBLE

Supóngase que simultáneamente a la transferencia de materia tiene lugar una reacción química irreversible en la fase líquida de ecuación cinética general

$$-r_A = f(C_A) \quad [2.3]$$

Aunque sería lógico pensar que esta situación corresponde exclusivamente al modelo límite de una reacción gas-líquido irreversible de un reactivo



Esto no es totalmente cierto puesto que se aproximan a ella todas las reacciones gas-líquido prácticamente irreversibles, ecuación [2.1], cuando la concentración del reactivo de la fase líquida, B, es considerablemente superior a la solubilidad de A y en consecuencia el perfil de concentración de B en las proximidades de la interfase puede considerarse plano, circunstancias

muy frecuentes con gases poco solubles, tales como el oxígeno.

Para estos procesos el flujo de A a través de la interfase puede expresarse en la forma

$$N_A = E K_L C_{A_i} = \eta f(C_{A_i}) = \beta N_A^* \quad [2.5]$$

introduciendo los factores de aceleración química, efectividad y aceleración turbulenta respectivamente, Charpentier (1981), Kulkarni y Doraiswamy (1975) y Camacho y Páez (1985).

Llegados a este punto se debe proponer el modelo para el mecanismo por el que tiene lugar la transferencia de materia en la fase líquida puesto que los coeficientes E, η y β dependen de las variables de operación. Por las razones comentadas se utilizará el modelo de la película, quedando representado el sistema considerado, de acuerdo con este modelo, por

$$D_A \frac{d^2 C_A}{dx^2} - f(C_A) = 0 \quad [2.6]$$

$$x = 0 \quad C_A = C_{A_i} \quad [2.7]$$

$$x = \delta \quad C_A = C_{A_0} \quad [2.8]$$

siendo δ el espesor de la película, parámetro de este modelo, que está relacionado con el coeficiente de transferencia de materia por

$$\delta = \frac{D_A}{K_L} \quad [2.9]$$

Si introducimos variables adimensionales en la forma

$$c = \frac{C_A}{C_{A i}} \quad y = x \frac{k_L}{D_A} \quad [2.10]$$

el sistema formado por las ecuaciones [2.6] a [2.8] quedará como sigue

$$\frac{d^2 c}{dy^2} = F(c) \quad [2.11]$$

$$y = 0 \quad c = 1 \quad [2.12]$$

$$y = 1 \quad c = c_0 \quad [2.13]$$

siendo

$$F(c) = \frac{D_A}{k_L^2} \frac{f(c)}{C_{A i}} \quad [2.14]$$

El flujo de A en cualquier punto de la fase líquida vendrá dado por la primera ley de Fick, que en función de las nuevas variables conduce a

$$(N_A)_y = -k_L C_{A i} (dc/dy)_y \quad [2.15]$$

Es evidente que la cinética más sencilla existente dentro de este tipo sería la de primer orden con respecto a A, y por tanto ha sido ampliamente estudiada en bibliografía.

Kulkarni y Doraiswamy (1976) y Camacho y col. (1985) aplican el tratamiento teórico a la cinética de orden n, y los últimos autores a la cinética hiperbólica, para considerar el cultivo de microorganismos limitado por O₂.

Dichas cinéticas vienen representadas, respectivamente, por ecuaciones del tipo

$$f(C_A) = k_n C_A^n \quad [2.16]$$

$$f(C_A) = \frac{k_h C_A}{K_A + C_A} \quad [2.17]$$

La solución del sistema [2.11] a [2.13] para las situaciones límites que pueden presentarse es:

a.- Difusión y reacción química en un medio semiinfinito

Si la reacción química es suficientemente rápida para que el soluto A se consuma por completo en la película adyacente a la interfase gas-líquido, régimen de reacción rápida ($\beta = 1$), la segunda condición límite, ecuación [2.13], se reduce a

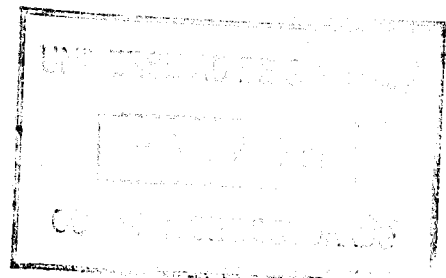
$$y = 1 \quad c = 0 \quad dc/dy = 0 \quad [2.18]$$

Utilizando el mismo método empleado en el tratamiento de la difusión y reacción química simultánea en un catalizador sólido poroso, Froment y Bischoff (1978), la ecuación diferencial [2.11] puede expresarse en la forma

$$d \left[\left[\frac{dc}{dy} \right]^2 \right] = 2 F(c) dc \quad [2.19]$$

que por integración en la película laminar, teniendo en cuenta las condiciones límites [2.12] y [2.18], conduce a

$$\left[\frac{dc}{dy} \right]_0 = - \left[2 \int_0^1 F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.20]$$



con lo que el flujo de A a través de la interfase vendrá dado por

$$N_A^* = k_L C_{A_i} \left[2 \int_0^1 F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.21]$$

Si se compara esta última expresión con la correspondiente a la absorción en presencia de una reacción química irreversible de primer orden en régimen de reacción rápida, Camacho y Páez (1985):

$$N_A^* = Ha k_L C_{A_i} \quad [2.22]$$

se observa que una definición general del módulo de Hatta para cualquier ecuación cinética, que mantiene válida la ecuación [2.22] es:

$$Ha = \left[2 \int_0^1 F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.23]$$

b.- Reacción química en un medio saturado de espesor finito

Si la reacción química es suficientemente lenta para que la concentración de A en el seno de la fase líquida coincida con su concentración en la interfase, régimen de reacción lenta, $\eta = 1$, el flujo de A vendrá dado por

$$N_A^{**} = f(C_{A_i}) L = f(1) L \quad [2.24]$$

siendo L el espesor de la fase líquida, cuyo valor medio en el aparato de contacto gas-líquido considerado viene dado por el cociente entre la retención de líquido, f_L , y el área interfacial

específica, a:

$$L = \frac{f_L}{a} \quad [2.25]$$

Introduciendo la función F, definida por [2.14], el flujo de A puede expresarse en la forma

$$N_{A^{**}} = F(1) \frac{k_L^2 C_{A i}}{D_A} L \quad [2.26]$$

que comparada con la expresión dada por Camacho y Páez (1985), para la absorción en presencia de una reacción química irreversible de primer orden en régimen de reacción lenta

$$N_{A^{**}} = Ha^2 \alpha_L k_L C_{A i} \quad [2.27]$$

conduce a la siguiente expresión general de un módulo relacionado con el espesor de la fase líquida

$$\alpha_L = \frac{f_L}{a} \frac{k_L}{D_A} \frac{F(1)}{2 \int_0^1 F(c) dc} = \alpha_0 \frac{F(1)}{2 \int_0^1 F(c) dc} \quad [2.28]$$

siendo α_0 el espesor adimensional de la fase líquida, denominado razón de Hinterland por Westerterp y col. (1984), y el quebrado que lo multiplica un coeficiente de corrección que permite mantener la forma de la ecuación [2.27] para cualquier cinética del tipo indicado por [2.3].

c.- Régimen intermedio

En el caso general será preciso resolver el sistema formado por las ecuaciones [2.11] a [2.13], teniendo en cuenta las expresiones de los módulos Ha y Da ecuaciones [2.23] y [2.28] respectivamente, propuestas en los apartados anteriores con el fin de que las ecuaciones [2.22] y [2.27], correspondientes a las dos situaciones límites, sean válidas para cualquier ecuación cinética.

Si la concentración de A en el seno de la fase líquida está comprendida entre cero y su valor en la interfase

$$0 < C_{A0} < C_{Ai} \quad \text{ó} \quad 0 < c_0 < 1 \quad [2.29]$$

el flujo de A a través del límite interior de la película debe consumirse por reacción química en el seno de la fase líquida bien mezclado

$$-k_L C_{Ai} \left[\frac{dc}{dy} \right]_1 = f(c_0) \left[L - \frac{D_A}{k_L} \right] \quad [2.30]$$

con lo que resulta

$$\left[\frac{dc}{dy} \right]_1 = -F(c_0) (c_0 - 1) \quad [2.31]$$

e integrando la ecuación [2.19], válida también en este caso, entre el límite interior de la película y un punto cualquiera de la misma

$$\frac{dc}{dy} = - \left[F(c_0)^2 (a_0 - 1)^2 + 2 \int_{c_0}^c F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.32]$$

separando variables e integrando de nuevo en todo el espesor de la película

$$\int_{c_0}^1 \frac{dc}{\left[F(c_0)^2 (a_0 - 1)^2 + 2 \int_{c_0}^c F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}}} = 1 \quad [2.33]$$

ecuación que permite el cálculo de c_0 por un método iterativo y una vez calculado este valor, el flujo de A a través de la interfase será, ecuaciones [2.15] y [2.32],

$$N_A = \left[F(c_0)^2 (a_0 - 1)^2 + 2 \int_{c_0}^1 F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} (k_L C_{A_i}) \quad [2.34]$$

comparando las ecuaciones [2.34] y [2.5] se obtiene la siguiente expresión para el factor de aceleración química

$$E = \left[F(c_0)^2 (a_0 - 1)^2 + 2 \int_{c_0}^1 F(c) dc \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.35]$$

a partir de la cual pueden calcularse también el factor de efectividad y el factor de aceleración turbulenta, ya que con las definiciones de Ha y a_L propuestas se mantiene la relación entre estos tres factores correspondiente a la absorción en presencia de una reacción irreversible de primer orden, Camacho y Páez (1985):

$$\beta = E/Ha = \eta Ha \alpha_L \quad [2.36]$$

2.1.2. APLICACION A LA CINETICA HIPERBOLICA

Las ecuaciones cinéticas de la forma

$$f(C_A) = \frac{k_h C_A}{K_A + C_A} \quad [2.37]$$

se presentan frecuentemente en sistemas químicos y biológicos. Así ocurre, por ejemplo, para muchas reacciones enzimáticas y cultivos de microorganismos en los que A es el nutriente limitante, si las concentraciones de enzima o de biomasa pueden considerarse uniformes en toda la fase líquida, ecuaciones de Michaelis-Menten y de Monod respectivamente.

En este caso la función F(c), [2.14], será:

$$F(c) = \frac{D_A k_h}{k_L^2 C_{A_i}} \frac{c}{\gamma + c} \quad [2.38]$$

donde

$$\gamma = K_A/C_{A_i} \quad [2.39]$$

Los módulos adimensionales Ha y α_L , [2.23] y [2.28], vendrán dados por

$$Ha = \left[\frac{2 D_A k_h}{k_L^2 C_{A_i}} \left[1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma)) \right] \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.40]$$

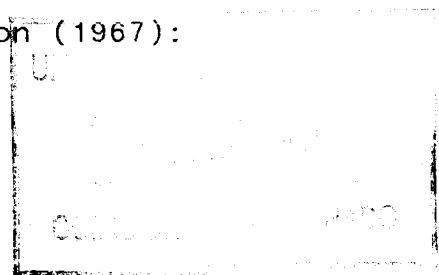
$$\alpha_L = \frac{\alpha_0}{2 (1 + \gamma)(1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma)))} \quad [2.41]$$

y las ecuaciones [2.33] y [2.35] quedan en la forma

$$\int_0^1 \frac{[1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma))]^{\frac{1}{2}} dc}{Ha \left[\left[\frac{Ha^2 c \delta (a_0 - 1)^2}{4 (\gamma + c_0)^2 (1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma)))} + \frac{[1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma))]^{\frac{1}{2}} dc}{+ c - c_0 + \gamma \ln \left[\frac{\gamma + c_0}{\gamma + c} \right]} \right]^{\frac{1}{2}}} = 1 \quad [2.42]$$

$$E = \left[\frac{Ha^4 c \delta (a_0 - 1)^2}{4 (\gamma + c_0)^2 (1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma)))^2} + \left. - Ha^2 \frac{1 - c_0 + \gamma \ln \left[\frac{\gamma + c_0}{\gamma + 1} \right]}{1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma))} \right]^{\frac{1}{2}} \quad [2.43]$$

Para el caso de mayor interés práctico de los procesos de fermentación aerobios, por su naturaleza autocatalítica, las desviaciones de la hipótesis de concentración uniforme de biomasa en la fase líquida tienden a incrementar la velocidad de absorción ya que si el crecimiento es limitado por oxígeno su velocidad será mayor en las proximidades de la interfase y además los microorganismos tienen tendencia a adsorberse sobre la superficie del líquido, Sobotka y col. (1981). Admitiendo, sin embargo, concentración uniforme de biomasa y considerando aplicable la ecuación de Monod para el crecimiento de microorganismos limitado por oxígeno, Johnson (1967):



$$(-r_{O_2}) = \frac{\mu_m X [O_2]}{Y_{O_2} (K_{O_2} + [O_2])} \quad [2.44]$$

que se ajusta a la forma de ecuación [2.37]. Los valores de K_{O_2} encontrados en la bibliografía para microorganismos industriales oscilan de 0,5 a $5 \cdot 10^{-6}$ M, Longmuir (1954) y Kappeli y Fiechter (1982), por lo que si como valor de $[O_2]_i$ se considera la solubilidad del oxígeno del aire en el medio de cultivo a 35 °C y 1 atm. que será del orden de $2 \cdot 10^{-4}$ M, Battino y Clever (1966), los valores de γ oscilarán entre 0,0025 y 0,025. Por esta razón en la figura 2.1 se han representado los valores de E frente a Ha para $\gamma = 0,01$ y diferentes valores de α_L , obtenidos mediante las ecuaciones [2.42] y [2.43]. Como era de esperar los resultados son muy próximos a los correspondientes a una reacción irreversible de orden cero, dado el pequeño valor de γ . En la figura 2.2 se representan los valores de E frente Ha para $\alpha_L = 100$ y diferentes valores de γ .

Comparando las ecuaciones [2.37] y [2.44] se observa que

$$k_h = \mu_m X / Y_{O_2} \quad [2.45]$$

por lo que el módulo de Hatta será proporcional a la raíz cuadrada de la concentración de biomasa, por tanto en la región de régimen de reacción lenta

$$E = Ha^2 \alpha_L \propto X$$

el crecimiento será exponencial; en la región de régimen hidrodinámico o de absorción física

$$E \approx 1$$

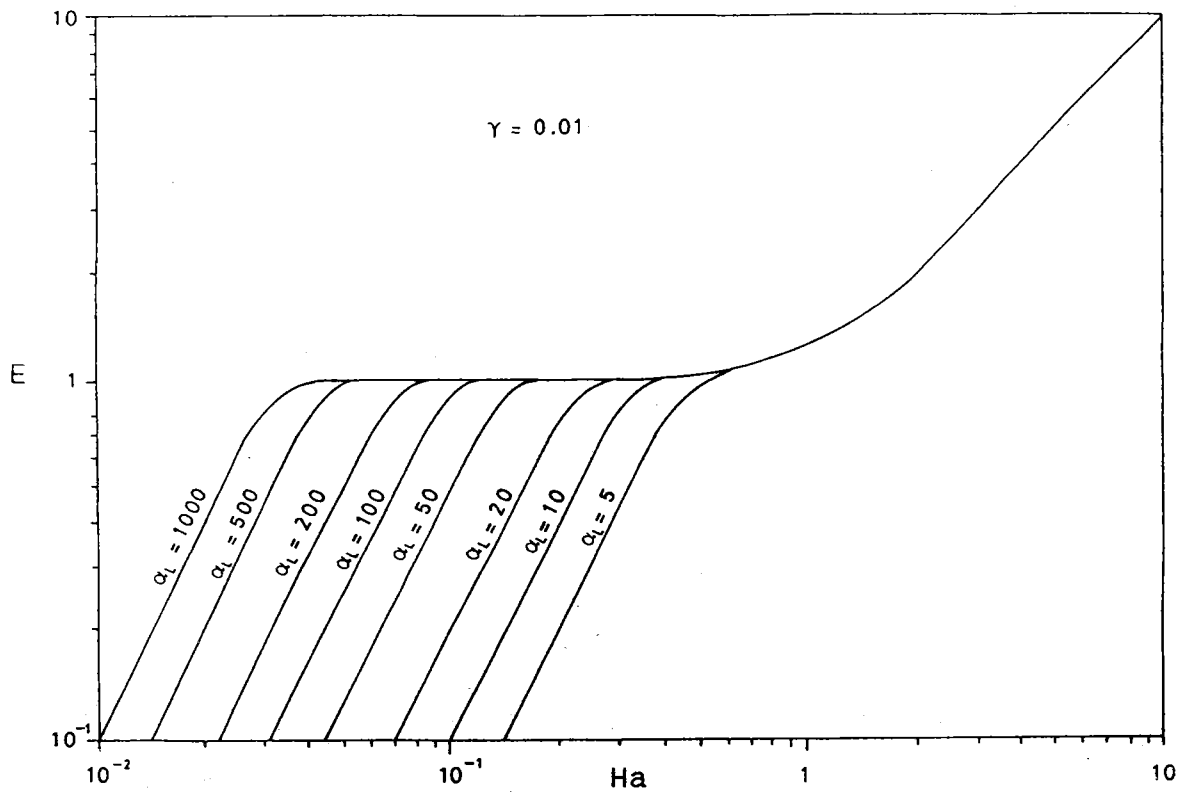


Figura 2.1

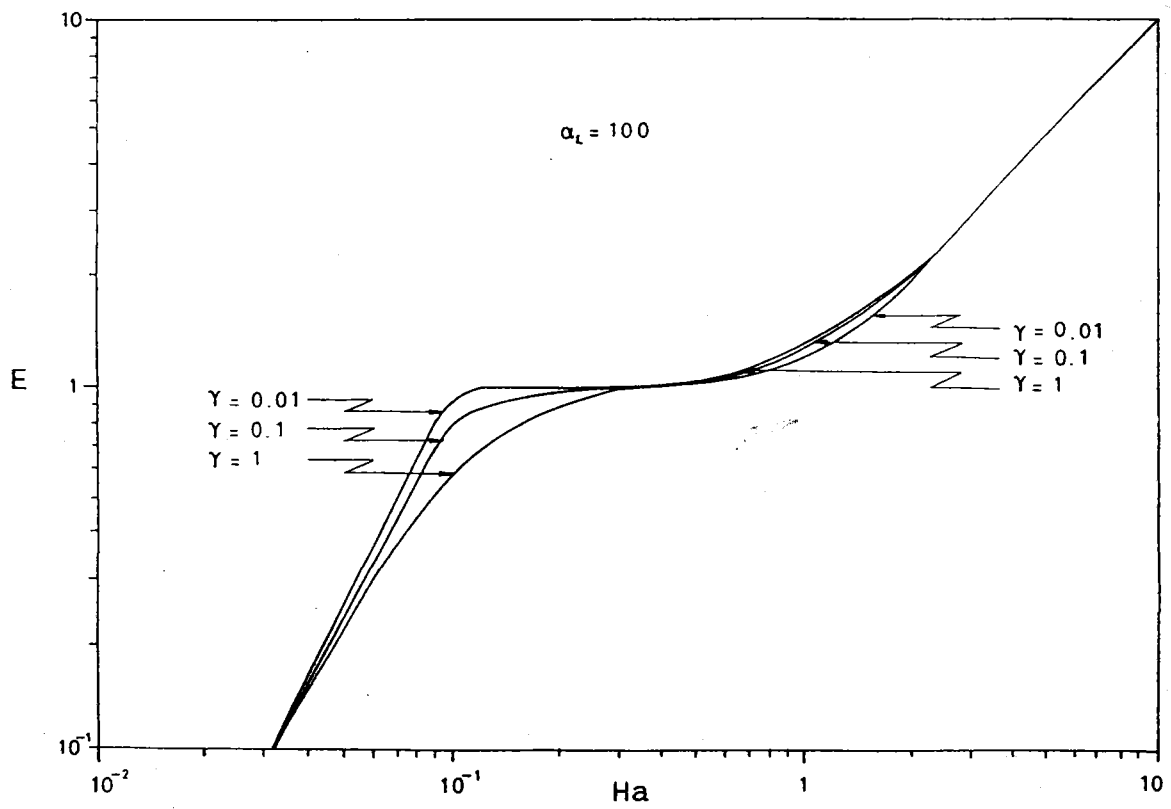


Figura 2.2

el crecimiento será lineal y al seguir aumentando la concentración de biomasa y por tanto el módulo de Hatta, debería encontrarse una situación intermedia entre el crecimiento exponencial y lineal

$$E = Ha \propto X^{1/2}$$

siempre que continúe siendo el oxígeno el nutriente limitante.

Sin embargo, experimentalmente sólo se observan las zonas de crecimiento exponencial y lineal, resultado lógico ya que de acuerdo con las ecuaciones [2.40] y [2.45] el módulo de Hatta en estos casos viene dado por

$$Ha = \left[\frac{2 D_{O_2}}{k_L^2 [O_2]_i} (\mu_m X/Y_{O_2})(1 + \gamma \ln(\gamma/(1 + \gamma))) \right]^{1/2} \quad [2.46]$$

y considerando valores medios representativos para la transferencia de oxígeno en sistemas aire-medio de cultivo a 35 °C

$$D_{O_2} = 7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h} \quad k_L = 0,5 \text{ m/h} \quad [O_2]_i = 6 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$$

resulta

$$Ha \approx 0,1 (\mu_m X/Y_{O_2})^{1/2} \quad [2.47]$$

ya que como se ha indicado anteriormente los valores de γ son generalmente pequeños. Si se tiene en cuenta que las velocidades de respiración o cociente metabólico del oxígeno de los microorganismos industriales oscilan en el intervalo

$$\mu_m/Y_{O_2} = 0,1 \text{ a } 0,6 \text{ h}^{-1}$$

y la concentración de biomasa en las fermentaciones aerobias, Lee y Luk (1983),

$$X = 1 \text{ a } 50 \text{ g/L}$$

considerando los valores máximos de ambos términos

$$Ha \approx 0,55$$

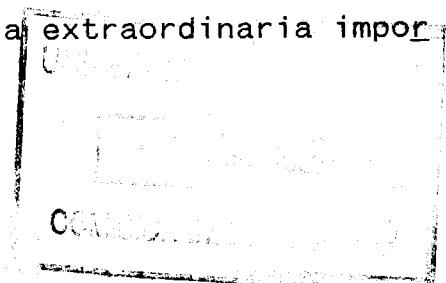
que indica que en el cultivo aerobio de microorganismos sólo tienen existencia los regímenes de reacción lenta y de absorción física o hidrodinámico.

2.2. TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN LA FERMENTACION AEROBIA

La escasa solubilidad del oxígeno en agua y los altos requerimientos de este componente en los procesos de fermentación aerobia determinan la necesidad de su suministro continuo y que al alcanzarse densidades de biomasa apreciables la transferencia de O_2 desde la fase gaseosa al medio de cultivo pueda convertirse en controlante del crecimiento de los microorganismos.

La demanda actual de biorreactores de alta productividad para los procesos de fermentación aerobia ha determinado un creciente interés por desarrollar nuevas configuraciones de biorreactores y modos de operación que favorezcan la mezcla e intensifiquen la transferencia de oxígeno gas-líquido, "Loop Reactors".

Estas circunstancias han determinado la extraordinaria impor



tancia del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $k_L.a$, como parámetro de diseño de los fermentadores aerobios y por tanto de la puesta a punto de métodos eficaces de medida del mismo y de sistemas modelos que permitan ensayar esas nuevas configuraciones y modos de operación de los biorreactores.

2.2.1. MEDIDA DE LA CAPACIDAD DE AIREACION

La medida del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $k_L.a$, en un contactor gas-líquido puede realizarse por diferentes métodos que se describen brevemente a continuación:

a.- Balance de oxígeno en la fase gaseosa

Puesto que los contactores gas-líquido son siempre continuos con respecto a la fase gaseosa la diferencia entre el caudal de oxígeno de entrada y el de salida debe corresponder al oxígeno absorbido por la fase líquida:

$$\begin{aligned} (G_{O_2})_{ent} - (G_{O_2})_{sal} &= N_g \frac{dY_{O_2}}{dt} + k_L.a ([O_2]^* - [O_2]) V \\ &\approx k_L.a ([O_2]^* - [O_2]) V \end{aligned} \quad [2.48]$$

si como ocurre generalmente el número de moles de gas existentes en el contactor es pequeño y el cambio de composición de esta masa de gas también, por lo que puede desprejarse la acumulación en la fase gaseosa existente en el interior del contactor.

Este método requiere medir el caudal y la composición del gas a la entrada y a la salida del reactor, medir la concentración de oxígeno en el seno de la fase líquida, $[O_2]$, y suponer

un tipo de flujo para el gas para calcular $[O_2]^*$.

Es el único método aplicable al fermentador sin alterar su funcionamiento.

b.- Métodos químicos

Si se dispone de un sistema químico en el que la absorción de oxígeno transcurre en el régimen de absorción física o hidrodinámico

$$N_{O_2} = k_L \cdot a [O_2]^* \quad [2.49]$$

es decir, en presencia de un soluto disuelto que reacciona con el oxígeno a una velocidad suficiente para anular su concentración en el seno de la fase líquida pero no para alterar apreciablemente su perfil de concentración en la película interfacial.

Este método requiere evaluar N_{O_2} por medida del consumo del soluto disuelto en la fase líquida y suponer también un tipo de flujo para el gas para calcular $[O_2]^*$.

Para su uso es preciso sustituir el medio de cultivo del fermentador por la disolución del reactivo de la fase líquida, por lo que implica un cambio importante del sistema. El método químico más utilizado con esta finalidad es la oxidación de SO_3^- a SO_4^- en presencia de Co^{++} , Linek y col. (1981).

c.- Métodos dinámicos

Se basan en analizar la respuesta del fermentador a un cambio brusco en la composición de la fase gaseosa, generalmente pasando a un gas inerte tal como nitrógeno o cortando la airea-

ción, Bandyopadhyay y col. (1963).

El método requiere registrar la variación de la concentración de oxígeno en el líquido mediante una sonda polarográfica o galvánica, obteniéndose resultados de la forma que se indican en la figura 2.3, donde se sustituye el aire por nitrógeno en el intervalo t_0-t_1 .

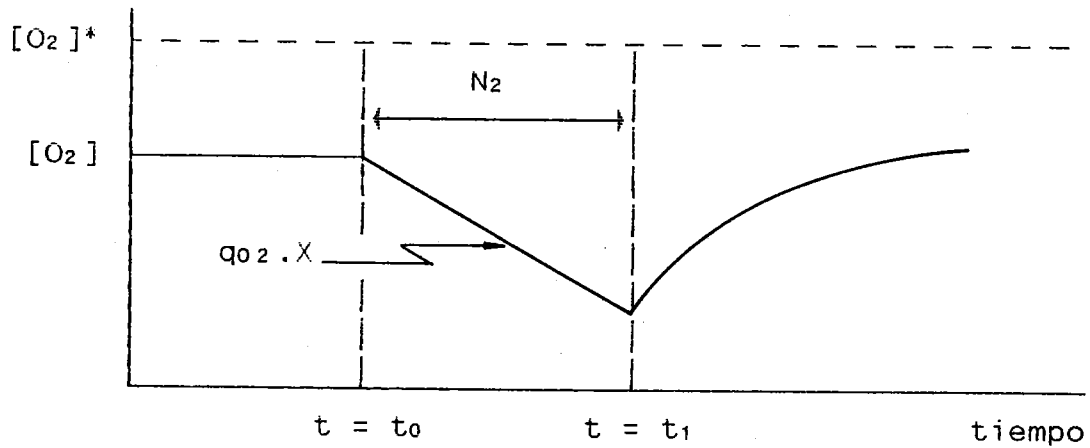


Figura 2.3

En esas condiciones un balance de oxígeno en la fase líquida conduce a:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]^* - [O_2]) - q_{02} \cdot X \quad [2.50]$$

siendo q_{02} la velocidad de respiración o cociente metabólico del oxígeno para los microorganismos considerados

$$q_{02} = \frac{\mu_m}{Y_{O_2}} \quad [2.51]$$

En el intervalo t_0 a t_1 la ecuación [2.50] se reduce a

$$\frac{d[O_2]}{dt} = -q_{O_2} \cdot X \quad [2.52]$$

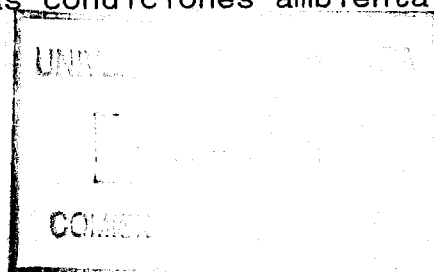
que permite la determinación de $q_{O_2} \cdot X$ por medida de la pendiente indicada en la figura 2.3, con lo que la ecuación [2.50] aplicada para el valor $[O_2]$ correspondiente a $t < t_0$ permite el cálculo de $k_L \cdot a$:

$$k_L \cdot a ([O_2]^* - [O_2]) = q_{O_2} \cdot X \quad [2.53]$$

2.2.2. APLICACION A LOS FERMENTADORES AEROBIOS

Siegl y Gaden (1962) analizan en su trabajo diferentes métodos para la medida de velocidades de transferencia de oxígeno en el cultivo de microorganismos aerobios y encuentran que la velocidad de absorción de oxígeno determinada por balance de este componente en la fase gaseosa: diferencia entre los caudales de entrada y salida de oxígeno es considerablemente superior a la velocidad de consumo de oxígeno en el seno de la fase líquida determinada mediante el método dinámico con un electrodo de oxígeno polarográfico (del orden de 2 veces). Por el contrario, cuando se trata de un sistema químico: oxidación de sulfito catalizada con Co^{++} , los resultados obtenidos comparando con el balance de oxígeno en la fase gaseosa son consistentes.

Estos autores interpretan sus resultados considerando que el cambio de composición de la fase gaseosa y de las condiciones de agitación que implica la aplicación del método dinámico altera la velocidad de consumo de oxígeno por los microorganismos y por tanto llegan a la conclusión de que únicamente los métodos directos que miden la velocidad de transferencia de oxígeno en presencia de los microorganismos y sin alterar las condiciones ambientales



del cultivo de los mismos son aplicables con esta finalidad.

Bennett y Kempe (1964) miden el consumo de oxígeno en un cultivo de células suspendidas de *Pseudomonas ovalis* por la velocidad de producción de ácido glucónico y aplicando el método dinámico mediante interrupción de la aireación y de nuevo encuentran velocidades marcadamente diferentes. La velocidad de absorción de oxígeno medida mediante un electrodo en el sistema no gaseado era aproximadamente la mitad que el valor calculado en el sistema gaseado por la velocidad de producción de ácido glucónico.

A la vista de estos resultados los autores sugieren la existencia de una ruta paralela para la absorción de oxígeno por las células mediante la adsorción de estas en la interfase gas-líquido desde la cual pueden absorber directamente el oxígeno de la fase gaseosa. Este mecanismo se vería favorecido por la tendencia de los microorganismos a adsorberse en la interfase, los mismos autores encuentran que la concentración celular en la espuma es 20 % superior a la existente en el seno del líquido.

Un mecanismo semejante había sido sugerido previamente por Bartholomew y col. (1950) si bien con una evidencia indirecta dadas las limitaciones del equipo de la época.

Tsao (1968 y 1970) desarrolla un modelo matemático teniendo en cuenta también el mecanismo directo y lo aplica a sus resultados previos con *Pseudomonas ovalis* y con glucosa-oxidasa, en este modelo considera que la enzima adsorbida en la interfase que se une directamente al oxígeno bloquea la interfase disminuyendo la velocidad de disolución y transferencia del oxígeno hacia el seno de la fase líquida.

Posteriormente Sobotka, Votruba y Prokop (1981) proponen un modelo de dos fases utilizando el mecanismo de flotación de partículas sólidas para explicar la unión de las células a las burbu-

jas de aire. Con este modelo los autores citados explican sus resultados previos con *Candida utilis* con etanol como sustrato y los de *Candida lipolytica* sobre n-alcenos.

2.3. TRANSFERENCIA DE OXIGENO EN SISTEMAS ENZIMATICOS

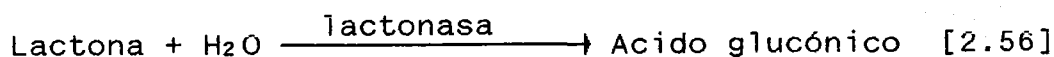
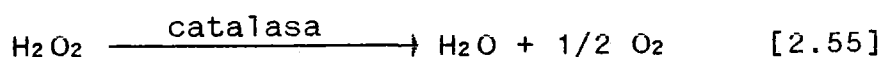
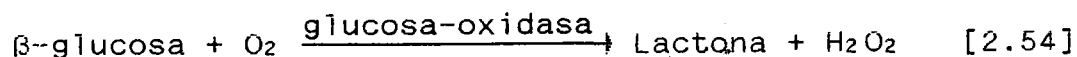
Como se ha indicado anteriormente el oxígeno molecular interacciona con dos tipos de enzimas: oxidasas y oxigenasas.

Las oxidasas usan el oxígeno como aceptor de hidrógeno formando H_2O o H_2O_2 .

Las oxigenasas son responsables de la incorporación del oxígeno molecular a los sustratos orgánicos y pueden incorporar al sustrato ambos átomos de oxígeno (dioxigenasas) o sólo uno (monooxigenasas).

El único sistema enzimático utilizado en estudios de transferencia de oxígeno gas-líquido ha sido la oxidación de disoluciones acuosas de glucosa con O_2 en presencia de glucosa-oxidasa, propuesto por Silver en 1963 y aplicado por Hsieh, Silver y Mateles (1969) utilizando un extracto crudo de *Aspergillus niger*.

La reacción considerada implica un mecanismo en tres etapas catalizadas por enzimas diferentes:



dado que el peróxido de hidrógeno puede desnaturalizar la glucosa-oxidasa y que la lactona actúa como inhibidor de la

misma, es preciso utilizar un sistema multienzimático con exceso de catalasa y lactonasa para evitar la acumulación de los productos intermedios.

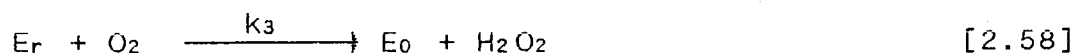
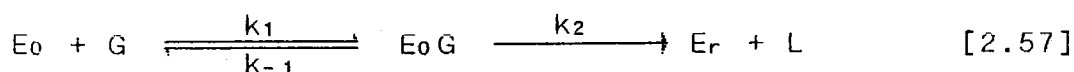
2.3.1. OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO EN PRESENCIA DE GLUCOSA-OXIDASA

Desde que Muller pone de manifiesto la existencia de la enzima glucosa-oxidasa en *Aspergillus niger* y *Penicillium glaucum*, en 1926-28, se han publicado un gran número de trabajos de investigación que describen las propiedades de enzimas iguales o similares en muchos hongos. El primer estudio, de carácter fundamentalmente cinético, de este sistema es debido a Nakamura y Ogura de la Universidad de Tokio (1962), que utilizan la enzima obtenida de *Penicillium amagasakiense* y siguen el transcurso de la reacción por medida de la absorbancia a 460 nm de la mezcla reaccionante, debida a la forma oxidada del grupo flavín de las dos unidades del dinucleótido flavín-adenín (FAD) que contiene cada molécula de enzima.

Estos autores aplican los métodos experimentales propuestos por Chance (1947 y 1957) para analizar separadamente las etapas reductiva y oxidativa de la enzima.

Sus resultados indican que no se forma una semiquinona intermedia entre el estado oxidado y reducido de los grupos flavín de la enzima, en cantidad apreciable para influir cinéticamente, lo que implica un proceso de transferencia de dos electrones y ausencia práctica de radicales libres en la mezcla reaccionante.

Proponen el mecanismo:



y obtienen los siguientes resultados a 25 °C y pH = 5.65:

$$k_{oxd} = k_3 = 1,4 \cdot 10^6, \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \quad [2.59]$$

$$\frac{1}{k_{red}} = \frac{1}{550} + 4,4 \cdot 10^{-5} \frac{1}{[G]}, \text{ s} \quad [2.60]$$

Correspondientes a las constantes cinéticas aparentes de pseudoprimer orden de las etapas de oxidación y reducción de la enzima respectivamente.

La ecuación [2.60] indica la formación de un complejo enzima-sustrato intermedio en la etapa reductiva, como expresa la ecuación [2.57] del mecanismo propuesto, y conduce a los valores:

$$k_2 = 550 \text{ s}^{-1} \quad [2.61]$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = 0,024 \text{ M} \quad [2.62]$$

Sin embargo, el establecimiento del mecanismo prácticamente aceptado hoy día es debido a Gibson, Swoboda y Massey, de la Universidad de Sheffield (1964), que utilizan glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger* y estudian la oxidación con oxígeno molecular de D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y D-xilosa.

Estos autores realizan sus experimentos por métodos manométricos y de flujo, Gibson y Milnes (1964).

Para la aplicación del método manométrico, utilizan un apa-

rato de Warburg, midiendo la velocidad de absorción de oxígeno en presencia de glucosa-oxidasa y catalasa a pH = 5,6; y variando la temperatura, fracción molar de oxígeno en la fase gaseosa y concentración de azúcar, en los intervalos:

$$T = 0 \text{ a } 25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$y_{O_2} = 0,105 \text{ a } 1$$

$$[G] = 0,01 \text{ a } 0,1 \text{ M}$$

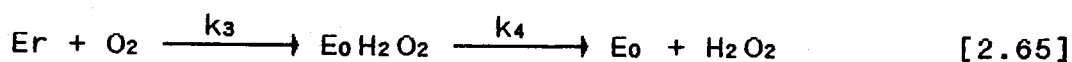
Reconociendo la posible influencia de la transferencia de materia gas-líquido, estos autores calculan la concentración de oxígeno en el seno de la fase líquida mediante la ecuación propuesta por Roughton

$$[O_2] = \frac{P_{O_2}}{H_d} \frac{V_n - V_r}{V_n} \quad [2.63]$$

siendo V_r la velocidad de reacción medida y V_n la velocidad de reacción a concentración infinita de enzima, es decir, cuando el proceso es controlado por la transferencia de materia.

En los experimentos de flujo estos autores no emplean catalasa, sino por el contrario añaden una concentración 1 mM de KCN para inhibir la posible catalasa contenida en la glucosa oxidasa.

Como resultado de la interpretación de los experimentos realizados estos autores proponen el mecanismo:



que conduce a la siguiente ecuación cinética:

$$r = \frac{r_{\max} [G] [O_2] e^{\tau}}{K_{mG} [O_2] + K_{mO_2} [O_2] + [G] [O_2]} \quad [2.66]$$

siendo

$$r_{\max} = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} \quad [2.67]$$

$$K_{mG} = \frac{r_{\max}}{k_1} \quad [2.68]$$

$$K_{mO_2} = \frac{r_{\max}}{k_3} \quad [2.69]$$

y obtienen los valores indicados en la tabla 2.1 para pH = 5.6

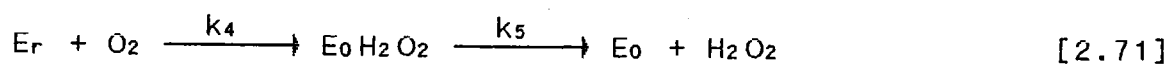
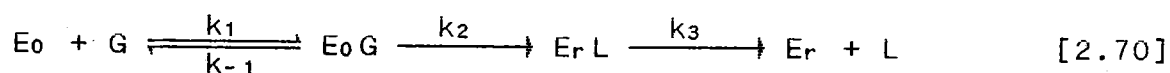
TABLA 2.1

<u>T</u> <u>°C</u>	<u>r_{max}</u> <u>M s⁻¹</u>	<u>K_{mG}</u> <u>M</u>	<u>K_{mO₂}</u> <u>mM</u>	<u>k₁</u> <u>M⁻¹ s⁻¹</u>	<u>k₂</u> <u>s⁻¹</u>	<u>k₃</u> <u>M⁻¹ s⁻¹</u>	<u>k₄</u> <u>s⁻¹</u>
0	235	0,12	0,21	2100	650	1,3 10 ⁶	370
13	590	0,11	0,29	5500	3300	1,7 10 ⁶	720
27	1150	0,11	0,48	10000	--	2,1 10 ⁶	1150
38	2000	0,12	0,83	16000	--	2,4 10 ⁶	2000

Los resultados de estos autores coinciden con los de Nakamura y Ogura en que la glucosa-oxidasa no parece existir en cantidad apreciable en una forma intermedia semiquinónica, sino que existen sólo dos formas espectrofotométricamente diferentes de la enzima, oxidada y reducida, entre las cuales se alternan las moléculas de la misma. No se forma, por tanto, en cantidad

apreciable un complejo ternario entre ambos sustratos y la enzima.

Bright y Gibson (1967), con objeto de profundizar en el mecanismo de la acción de esta enzima aplican los mismos métodos experimentales a la oxidación de D-glucosa deuterada en el carbono 1. El efecto isotópico influye en la velocidad global del proceso, fundamentalmente en la etapa de reducción del grupo flavín indicando la existencia de un complejo entre la enzima oxidada y D-glucosa, que altera el mecanismo indicado en las ecuaciones [2.64] y [2.65] en la forma:



y despreciando la concentración de enzima en las formas E_rL y $E_0H_2O_2$ conduce a la ecuación cinética

$$\frac{e_r}{r} = \frac{1}{k_2} + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 k_2} \frac{1}{[G]} + \frac{1}{k_4} \frac{1}{[O_2]} \quad [2.72]$$

También estudian comparativamente la oxidación de D-glucosa no deuterada, encontrando que los resultados experimentales se ajustan a la interpretación del trabajo experimental previo de Gibson, Swoboda y Massey. Sin embargo, a la temperatura de 3 °C los resultados experimentales también pueden ajustarse mediante la ecuación [2.72], aunque el error en la determinación de k_2 es apreciable ($\approx \pm 25\%$). Para pH = 5.55 y disolución 1 mM de KCN los valores obtenidos son los que se indican en las tablas 2.2 y 2.3,

TABLA 2.2

<u>Sustrato</u>	<u>T, °C</u>	<u>r_{max}, MS⁻¹</u>	<u>K_{mG}, M</u>	<u>K_{mO2}, mM</u>	<u>k₋₁/k₁, M</u>
D-Glucosa-1-H	25	1440	0,11	0,82	---
D-Glucosa-1-D	25	184	0,054	0,12	---
D-Glucosa-1-H	3	330	0,167	0,25	0,042
D-Glucosa-1-D	3	67	0,067	0,045	0,042

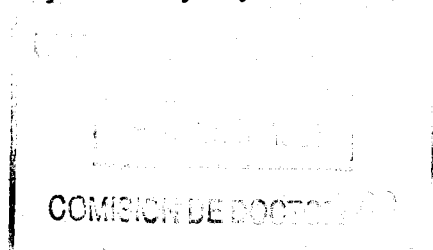
TABLA 2.3

<u>Sustrato</u>	<u>T, °C</u>	<u>k₁ M⁻¹s⁻¹</u>	<u>k₋₁ s⁻¹</u>	<u>k₂ s⁻¹</u>	<u>k₃ s⁻¹</u>	<u>k₄ M⁻¹s⁻¹</u>	<u>k₅ s⁻¹</u>
D-Glucosa-1-H	25	13158	--	--	---	1,8 10 ⁶	1440
D-Glucosa-1-D	25	---	--	--	---	---	--
D-Glucosa-1-H	3	2100	90	1000	784	1,2 10 ⁶	570
D-Glucosa-1-D	3	2100	90	67	---	---	--

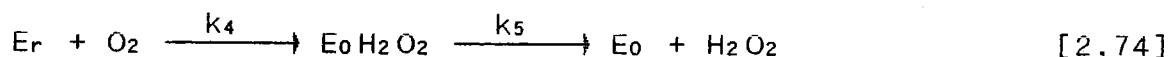
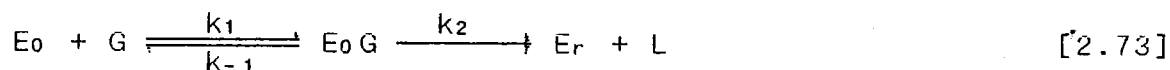
en las que se aprecia el importante efecto isotópico observado a la temperatura de 3 °C en el valor de k₂ para la glucosa normal y la deuterada. Estos autores también realizan experimentos utilizando como disolvente agua deuterada sin observar ningún efecto sobre la velocidad de reacción ni sobre las etapas del mecanismo.

Bright y Appleby (1969) estudian la influencia del pH sobre las etapas individuales de la reacción, utilizando glucosa oxidasa de *Penicillium notatum* y D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa y D-manosa como sustratos. Realizan sus experimentos a la temperatura de 25 °C, en disoluciones 0,2 M en KCl y en el intervalo de pH de 3 a 8.

Los resultados obtenidos por estos autores se ajustan al mecanismo propuesto por Gibson, Swoboda y Massey y modificado



ligeramente por Bright y Gibson



La variación de k_1 con el pH es sigmoideal e indica que la combinación del sustrato con E_0 depende de un grupo básico ($pK_1 = 5,00$) de la enzima, que debe estar desprotonado para que se produzca la unión.

La reducción del grupo flavín controlada por k_2 es relativamente insensible al pH en el intervalo investigado.

La variación de k_4 con el pH es también sigmoideal e indica que en la combinación del O_2 con E_r interviene un grupo ácido ($pK_4 = 6,90$) de la enzima, que debe estar protonado para que se produzca la unión.

Finalmente, la variación de k_5 con el pH tiene forma de una curva de Gauss con el máximo entre 5 y 7, indicando que esta etapa depende de un grupo ácido ($pK_5 = 7,40$) y de un grupo básico ($pK_5 = 4,10$) de la enzima.

Duke y col. (1969) emplean por primera vez un electrodo de oxígeno para seguir la cinética de la reacción, aunque también realizan experimentos de flujo y encuentran la necesidad de añadir una etapa más al mecanismo propuesto por Gibson y colaboradores, representado por las ecuaciones [2.73] y [2.74]; esta etapa es



y representa por tanto una activación de sustrato.

Con esta etapa la ecuación cinética toma la forma

$$\frac{e\tau}{r} = \frac{1}{k_1 [G]} + \frac{1}{k_1 + k_6 [G]} + \frac{1}{k_4 [O_2]} + \frac{1}{k_5} \quad [2.76]$$

En los experimentos con el electrodo de oxígeno se sigue la desaparición de éste con el tiempo al añadir la enzima a una disolución de glucosa saturada de oxígeno, régimen no estacionario, por lo que es preciso integrar la ecuación anterior, que conduce a

$$t = \frac{1}{e\tau} \left[\left[\frac{1}{k_5} + \frac{1}{k_1 [G]} + \frac{1}{k_2 + k_6 [G]} \right] ([O_2]_0 - [O_2]) + \right. \\ \left. + \frac{2,303}{k_4} \ln \left[\frac{[O_2]_0}{[O_2]} \right] \right] \quad [2.77]$$

para concentraciones de glucosa superiores a 0,1 M, con lo que su concentración puede suponerse constante, y

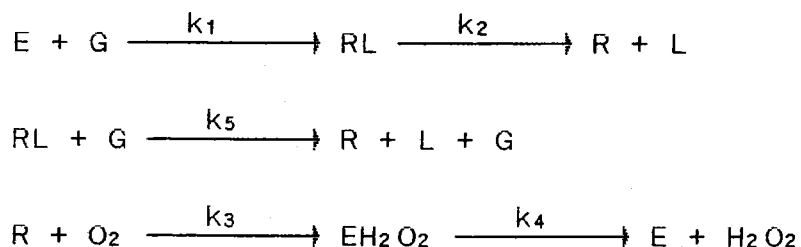
$$t = \frac{2,303}{e\tau} \left[\frac{[O_2]_0 - [O_2]}{2,303 k_5} + \frac{1}{k_1} \ln \left[\frac{[G]_0}{[G]} \right] + \right. \\ \left. + \frac{1}{k_6} \ln \left[\frac{k_2 + k_6 [G]_0}{k_2 + k_6 [G]} \right] + \frac{1}{k_4} \ln \left[\frac{[O_2]_0}{[O_2]} \right] \right] \quad [2.78]$$

para concentraciones de glucosa menores de 0,1 M.

Estos autores realizan sus experimentos a pH = 5,6, a las

temperaturas de 0, 15 y 30 °C y en presencia de una concentración 10^{-3} M de NaCN para suprimir la acción de la catalasa que pudiera estar presente en la glucosa oxidasa y acomplejar cualquier ión pesado que pudiera inhibir la enzima

Sobre el esquema:



Los valores de las constantes cinéticas obtenidos son los indicados en la tabla 2.4.

TABLA 2.4

	<u>T = 0 °C</u>	<u>T = 15 °C</u>	<u>T = 30 °C</u>
$k_1, M^{-1} \text{ min}^{-1}$	$2,2 \cdot 10^5$	$5,5 \text{ a } 7,0 \cdot 10^5$	$1,43 \cdot 10^6$
$k_2, \text{ min}^{-1}$	$2,3 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^4$	----
$k_3, M^{-1} \text{ min}^{-1}$	$7,5 \text{ a } 7,8 \cdot 10^7$	$1,20 \text{ a } 1,26 \cdot 10^8$	$1,60 \cdot 10^8$
$k_4, \text{ min}^{-1}$	$2,0 \text{ a } 2,3 \cdot 10^4$	$4,1 \text{ a } 4,3 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4$
$k_5, M^{-1} \text{ min}^{-1}$	$2,6 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^6$	----

Weibel y Bright (1971) estudian el mecanismo de acción de la glucosa oxidasa con vistas a interpretar la dependencia de la velocidad de reacción con el pH, utilizando glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger* y determinando la velocidad de reacción mediante experimentos a 25 °C, con glucosa como sustrato y en el rango de pH de 3 a 10. La cinética del proceso es seguida mediante un electrodo de oxígeno, aunque se comprobaron también los resulta-

dos con experimentos mezcla rápida seguidos por métodos espectrofotométricos.

Los datos eran ajustados por una ecuación de estado estacionario de tres parámetros

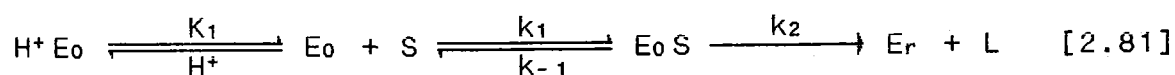
$$\frac{e_T}{r} = \frac{1}{k_{red}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_{oxd}} \frac{1}{[O_2]} + \frac{1}{k_{cat}} \quad [2.79]$$

que integrada conduce a

$$\begin{aligned} (e_T t) = & \frac{1}{k_{red}} + \ln \left[\frac{[S]_0}{[S]_0 - ([O_2]_0 - [O_2])} \right] + \\ & + \frac{1}{k_{oxd}} \ln \left[\frac{[O_2]_0}{[O_2]} \right] + \frac{1}{k_{cat}} ([O_2]_0 - [O_2]) \end{aligned} \quad [2.80]$$

y las conclusiones obtenidas pueden resumirse de la siguiente forma

- A bajos pH, en presencia de haluros, la velocidad de reacción es determinada enteramente por la velocidad de la etapa de reducción de flavina (k_2) en la semirreacción reductiva. Por otra parte, el sustrato se combina sólo con una forma no protonada de la enzima oxidada y la semirreacción reductiva puede representarse así:



Los resultados obtenidos sugieren que es probable que la velocidad de reacción en el rango de bajos pH esté limitada por k_2 también en ausencia de haluros.

- La importancia de k_2 como etapa de primer orden limitante disminuye al elevarse el pH, así a pH = 10 el proceso limitante parece ser la ruptura del complejo de la enzima oxidada ($E_0H_2O_2$) en la semirreacción oxidativa.

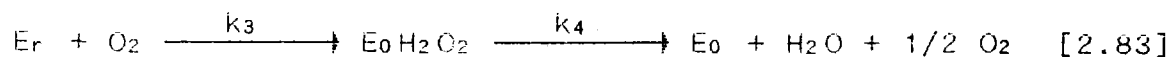
Los trabajos de investigación que estudian este sistema desde el punto de vista de su aplicación para el estudio de la transferencia de oxígeno gas-líquido se inician con el trabajo ya comentado de Hsieh, Silver y Mateles en 1969 que explican los resultados obtenidos utilizando una ecuación tipo Michaelis-Menten para la velocidad de la reacción enzimática.

Posteriormente Lee y Tsao (1972) comparan un catalizador químico heterogéneo, platino depositado sobre pequeñas partículas de carbono, con la enzima glucosa-oxidasa en el estudio de la absorción de oxígeno por disoluciones de glucosa. Estos autores simplifican aun más la ecuación cinética considerándola de seudoprimer orden.

El primer trabajo de carácter ingenieril en el que se utiliza una ecuación de velocidad basada en los estudios cinéticos de carácter bioquímico comentados anteriormente es debido a Fukushima, Uyama y Katayama (1978), si bien los parámetros cinéticos obtenidos por estos autores difieren considerablemente de los indicados anteriormente.

Son realmente Linek y col. (1980 y 1981) los que han realizado un estudio más extenso y profundo para la aplicación de este sistema a la medida de velocidades de transferencia de oxígeno. En el primer trabajo estudian la cinética de la reacción enzimática partiendo del mecanismo:





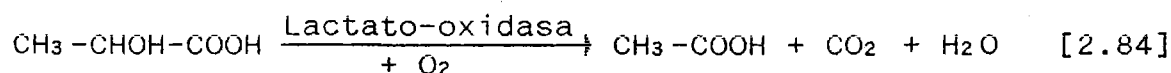
en un reactor discontinuo a 25 °C y pH = 5,55. Estos autores tienen en cuenta la mutarrotación de la glucosa y el retraso del electrodo de oxígeno utilizado para seguir la cinética del proceso. Los parámetros cinéticos determinados son consistentes con los de los trabajos cinéticos previos de carácter bioquímico.

En el segundo trabajo estudian la aplicación de este sistema a la medida de la capacidad de aireación de fermentadores con resultados prometedores.

2.3.2. OTROS SISTEMAS ENZIMATICOS

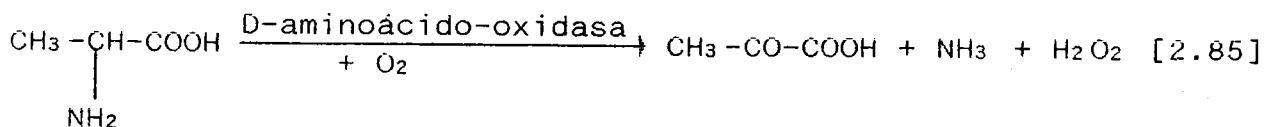
Como consecuencia del estudio bibliográfico realizado sobre las oxidorreductasas que utilizan el oxígeno molecular, algunos sistemas prometedores son:

a) La oxidación y descarboxilación simultáneas del ácido láctico a ácido acético mediante la enzima lactato-oxidasa (EC.1.13.12.4).



que se produce cuantitativamente y no requiere cofactores externos, Makovos y Liu (1985).

b) La oxidación y desaminación simultánea de D-alanina a ácido pirúvico mediante la enzima D-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.3).



que también se produce prácticamente de forma cuantitativa y no requiere cofactores externos, Laser (1952).

2.4. OBJETO DE LA PRESENTE INVESTIGACION

La investigación de que se da cuenta en esta memoria forma parte de la línea de investigación sobre "Transferencia de Oxígeno en Biorreactores" del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada y en ella se inicia el estudio de la aplicabilidad de los sistemas enzimáticos para determinar las características de aireación de biorreactores.

En esta investigación se decidió utilizar un tanque agitado discontinuo con respecto de la fase líquida con superficie interfacial plana y seguir el proceso mediante la lectura de un electrodo de oxígeno.

En estas condiciones de mínimo coeficiente volumétrico de transferencia de materia y evitando el burbujeo de la fase gaseosa se disminuyen al máximo los factores que pueden influir sobre la lectura del electrodo de oxígeno como el grado de mezcla de la fase gaseosa y la retención del gas por la fase líquida y se obtienen las condiciones idóneas para el estudio cinético de la reacción enzimática y del mecanismo directo de absorción de oxígeno.

Los sistemas enzimáticos fueron:

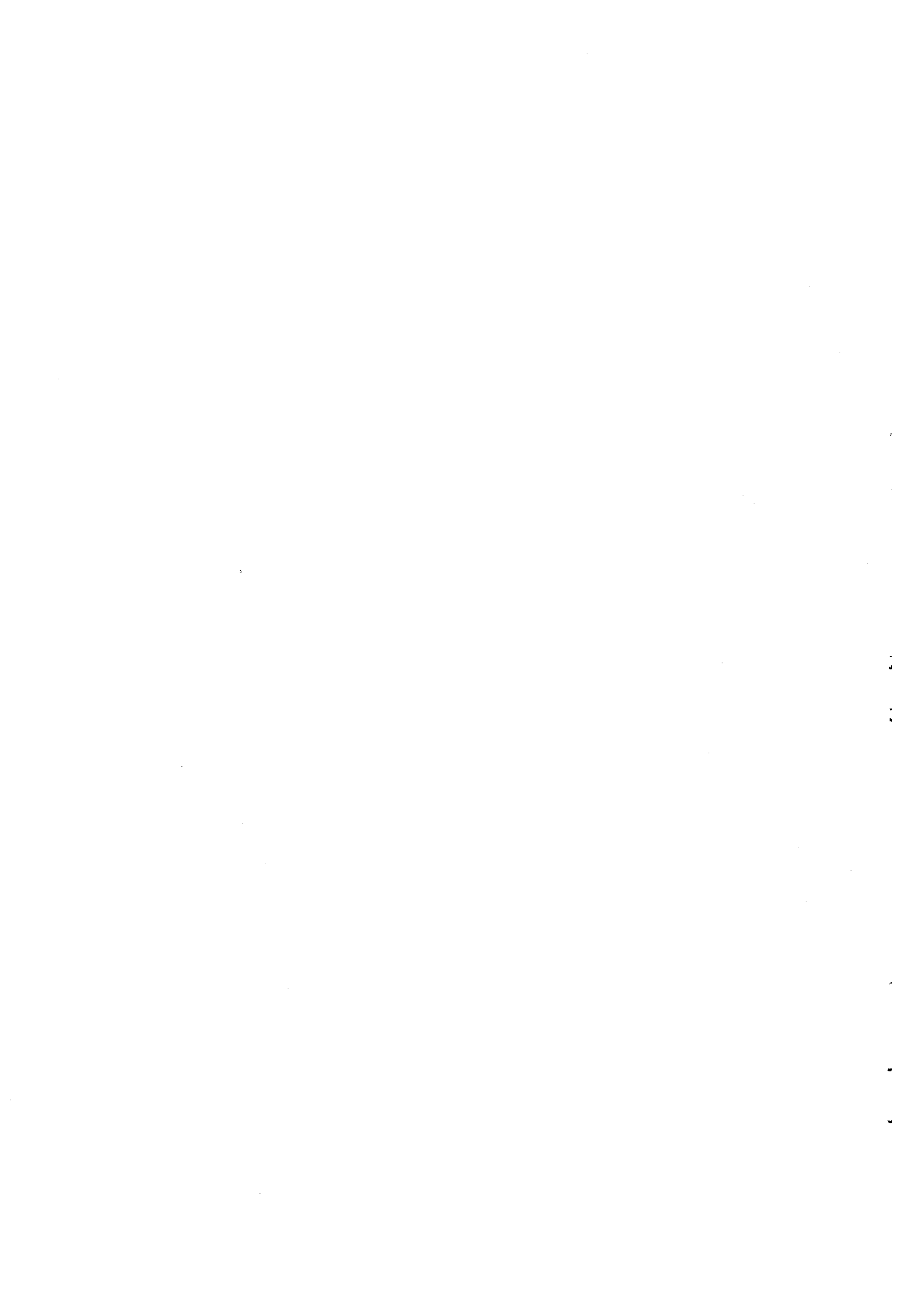
- la oxidación de glucosa en presencia de glucosa-oxidasa, y
- la oxidación de alanina en presencia de D-aminoácido-oxidasa.

ya que el precio actual de la lactato-oxidasa, comentada en el apartado anterior, la hacia descartable para su aplicación posterior en grandes equipos con la finalidad indicada.

Con el primer sistema se seleccionaron, en primer lugar, sus condiciones óptimas de acuerdo con la información bibliográfica: 25 °C y pH = 5,55, y en estas condiciones se analizó la influencia de las concentraciones de glucosa-oxidasa, catalasa y glucosa y de la composición de la fase gaseosa.

A continuación se analizó la influencia de la temperatura en el intervalo de 25 a 50 °C, que puso de manifiesto su apreciable desnaturalización térmica a las temperaturas superiores, y por tanto la necesidad de un estudio independiente de este proceso.

Con el segundo sistema se trabajó únicamente en sus condiciones óptimas: 39 °C y pH = 7,3, analizándose la influencia de las concentraciones de D-aminoácido-oxidasa y alanina.



3. TECNICAS UTILIZADAS



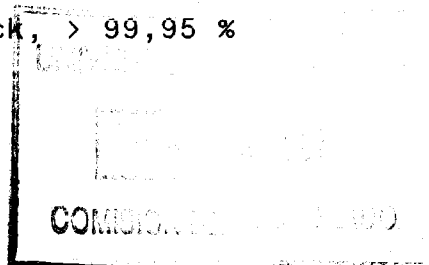
3.1. MATERIALES Y METODOS

A continuación se describen los productos químicos, instalaciones experimentales, procedimientos y métodos de análisis utilizados en esta investigación.

3.1.1. PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS

Las características de los productos químicos utilizados son:

- D(+)-glucosa, anhidra purísima, Panreac
- DL-alanina, grado Sigma, Sigma
- Glucosa-oxidasas, de *Aspergillus niger*, cruda, Sigma
- D-aminoácido-oxidasas, de riñón de cerdo, cruda, Sigma
- Catalasa, de hígado de bovinos, purificada, Sigma
- Potasio fosfato dibásico, purísimo, Probus
- Acido cítrico, anhidro para análisis, Panreac, 99,5 %
- Potasio cianuro, purísimo, Panreac, 99 %
- Oxígeno, Oxhídrica Malagueña, envasado en balas de acero a 150 atm., 99 %
- Nitrógeno, Oxhídrica Malagueña, envasado en balas de acero a 115 atm., 99 %
- Titanio bióxido, químicamente puro, Probus
- Agua oxigenada, neutra estabilizada, 3 %
- Sodio tiosulfato 5-hidrato, purísimo, Panreac
- Sodio carbonato, pro-análisis, Merck, > 99,95 %



- Almidón, pro-análisis, Merck
- Potasio ioduro, para análisis, Panreac
- Potasio dicromato, pro-análisis, Merck, > 99,5 %
- Amónico molibdato, para análisis, Panreac
- Acido sulfúrico, 66 °Bé, Probus, 95 - 97 %

3.1.2. INSTALACION EXPERIMENTAL

La instalación experimental constaba de las siguientes partes:

- a) Sistema de control y medidor del caudal de oxígeno y nitrógeno.- Ambos gases procedentes de su correspondiente bala de acero, equipada con su manorreductor, pasaban por una válvula de aguja, para la regulación fina del caudal, y a continuación por dos rotámetros calibrados a temperatura ambiente, uno para el oxígeno y otro para el nitrógeno.

Los datos y gráficos de los calibrados se hallan reflejados en el Anexo I de esta Memoria.

- b) Sistema de termostatación y saturación de la fase gaseosa.- Se ha utilizado un termostato Tectron con agua como fluido de calefacción para asegurar la constancia de la temperatura de operación dentro del reactor, haciendo circular el agua procedente del baño termostatizado a través de la camisa de éste. Al mismo tiempo dicho baño aproximaba la temperatura del gas que entraba en el reactor a la temperatura de cada experimento. Para ello y dado que había que saturar la fase gaseosa con respecto a la fase líquida, una vez medido el caudal de éste se

hacía pasar por un saturador conteniendo la misma disolución que el reactor pero en ausencia de enzima, y que estaba introducido en su mayor parte en el baño mencionado. El paso del gas a través del reactor se producía lamando la superficie del líquido, sin burbujeo.

- c) Sistema de contacto gas-líquido.- El contacto gas-líquido tenía lugar en un reactor de vidrio, único a lo largo de toda la investigación. Dicho reactor era de cabeza separable, de cuerpo cilíndrico y base redonda, encamisado para la circulación del agua de calefacción, con un diámetro interno de 75 mm y una capacidad máxima de 250 mL, provisto de tapa con cinco bocas esmeriladas que aseguraba el perfecto cierre del reactor. Las cinco bocas esmeriladas de la tapa del reactor fueron utilizadas del siguiente modo:

- Entrada del gas procedente del saturador.
- Salida del gas a la atmósfera, unida a un contador de burbuja que era utilizado para la calibración de los rotámetros y que consistía en una bureta graduada.
- Introducción de la disolución de enzima y toma de muestra en los ensayos de desnaturalización térmica.
- Termómetro para medir la temperatura de la fase líquida.
- Electrodo Gallenkamp para la medida de la concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida.

d) Sistema de agitación.- Se utilizaba un agitador magnético SBS para asegurar la homogeneidad de la fase líquida.

En la figura 3.1 aparece un diagrama del montaje experimental utilizado en este trabajo, donde quedan reflejados todos los sistemas comentados.

En resumen y dadas las condiciones de agitación en que se realizaron los experimentos se puede considerar mezcla perfecta de la fase líquida con apenas aparición de vórtice y área interfacial considerada plana e igual a $45,5 \text{ cm}^2$.

3.1.3. PROCEDIMIENTOS DE TRABAJO

Los procedimientos experimentales fueron los siguientes:

a.- Experimentos con O_2 puro

En cada serie de experimentos se tenía preparada la disolución tampón requerida. Al inicio del experimento, al mismo tiempo que se conectaba el termostato para alcanzar la temperatura de trabajo, se añadía a dicha disolución tampón el sustrato correspondiente preparando de este modo el volumen de disolución a utilizar en el reactor (200 ml en el caso de trabajar con glucosa-oxidasa y 100 ml si era con D-amioácido-oxidasa).

Se introduce la disolución en el reactor, cerrándolo y colocando en cada boca esmerilada el correspondiente aparato de medida y se pone en marcha el agitador magnético.

A continuación se abre la válvula de oxígeno para comenzar la saturación de la fase líquida, asegurando un caudal durante todo el proceso de 25 L/h en condiciones ambientes; observándose la variación de concentración de oxígeno disuelto gracias a la

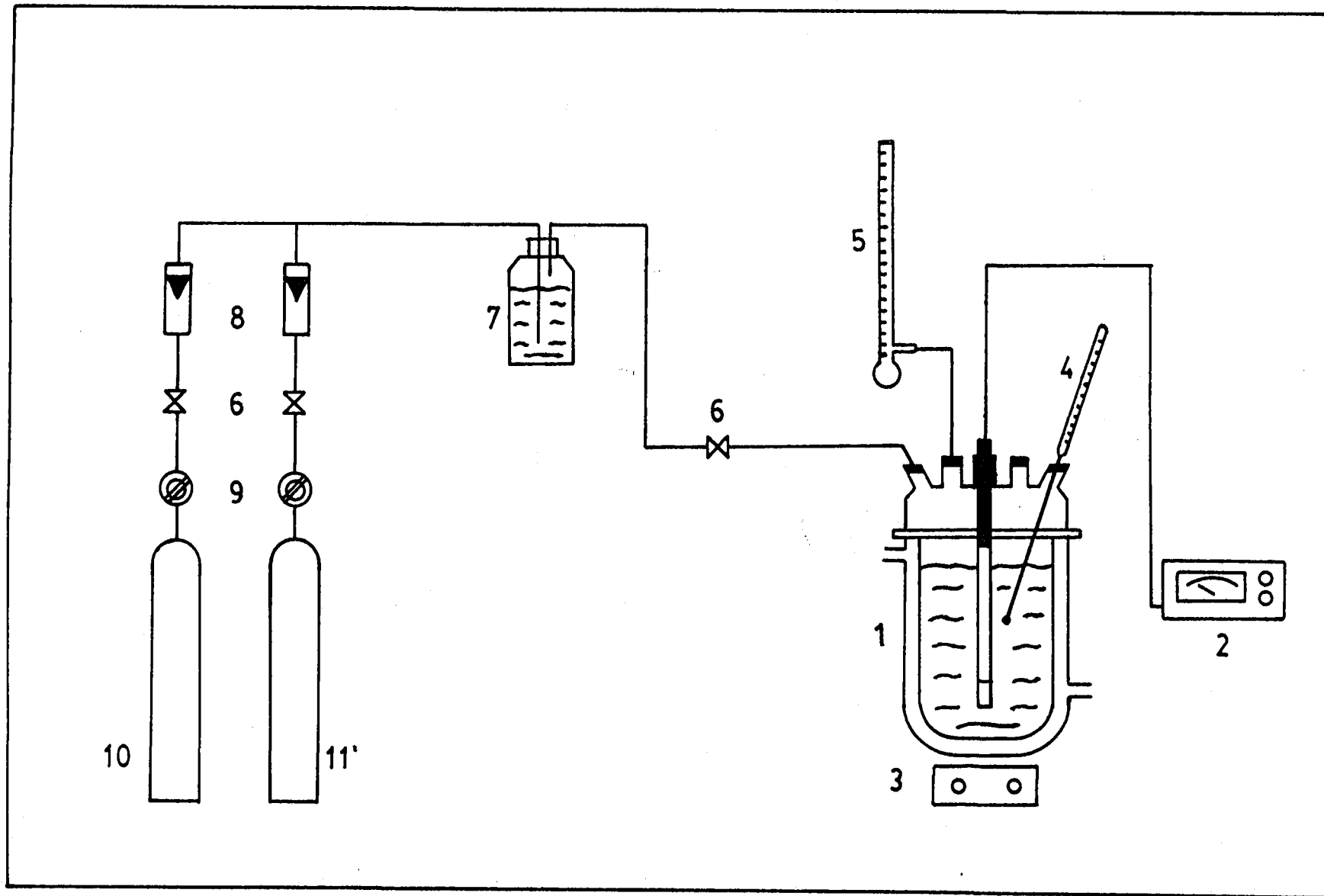


Figura 3.1

1. Reactor encamisado.
2. Sistema medidor de oxígeno disuelto.
3. Agitador magnético.
4. Termómetro.
5. Contador de burbuja.
6. Válvula.
7. Saturador.
8. Rotámetro.
9. Manorreductor.
10. Bala de nitrógeno.
11. Bala de oxígeno.

ayuda del electrodo de oxígeno previamente calibrado (el calibrado se realiza a los valores 0 % y 100 % de saturación pasando una corriente pura de nitrógeno y oxígeno, respectivamente, hasta que la medida del electrodo permanece constante). El proceso de saturación nunca dura menos de hora y media.

Una vez alcanzado el 100 % de saturación se toma el volumen de enzima necesario y se introduce en el reactor. A partir de este momento se esperan 30 segundos, tiempo considerado suficiente como para cerrar de nuevo el reactor y alcanzar la mezcla de las dos soluciones.

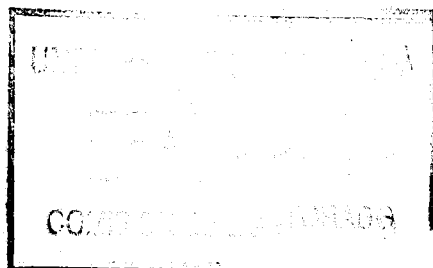
A partir de este mismo instante se considera $t = 0$ y se empiezan a anotar parejas de valores tiempo, % de saturación, sin interrumpir el flujo de oxígeno.

En los ensayos de desnaturalización térmica se mide el tiempo y se determina experimentalmente la actividad de la enzima mediante el método que se comentará en el apartado correspondiente a los Métodos de Análisis.

Se comprobó que en todos los experimentos realizados, el tampón utilizado permitía mantener prácticamente constante el pH durante el tiempo del experimento, aunque en las oxidaciones se producen compuestos de carácter ácido: glucónico y pirúvico, respectivamente.

b.- Experimentos con mezclas oxígeno-nitrógeno

Se procede del mismo modo al apartado anterior, variando el flujo de cada uno de los gases hasta alcanzar el porcentaje a emplear. Dicho porcentaje se mantiene constante a lo largo de cada experimento, así como el caudal total (suma de ambos) que se fijó en 25 L/h.



c.- Experimentos dinámicos

En las series correspondientes a estos experimentos se operaba de modo algo distinto, debido a que no se utilizaba disolución de enzima y la concentración de sustrato era siempre igual a 0,1 M. En estos ensayos se somete al sistema considerado a un cambio en la composición de la fase gaseosa y se sigue el cambio de la concentración de oxígeno en la fase líquida con el tiempo.

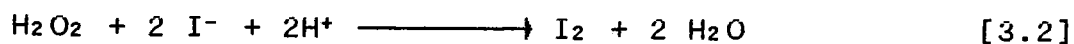
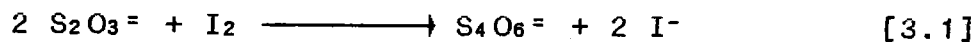
3.1.4. METODOS DE ANALISIS

Bajo este epígrafe se comenta la determinación experimental de la actividad de las enzimas glucosa-oxidasa y D-aminoácido-oxidasa, basada en los estudios realizados por Pifferi y col (1981).

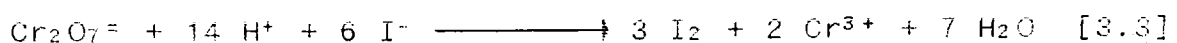
a.- Valoración del H₂O₂

Se parte de una disolución de H₂O₂ comercial, reactivo de análisis, que se valora por el método iodométrico.

La valoración del H₂O₂ se basa en las dos reacciones siguientes



Debido a que el tiosulfato sódico no es una sustancia patrón, una vez preparada la disolución del mismo se debe proceder a su valoración con una sustancia que si lo sea, utilizándose en este caso dicromato potásico. La ecuación ahora implicada, será la siguiente, Kolthoff (1972).



Como concentración del H_2O_2 siempre se ha tomado el valor medio de al menos tres determinaciones y que en ningún caso diferían en más de un 1 % de dicho valor medio.

b.- Preparación de los patrones. Obtención de la recta de calibrado

Se prepara una disolución madre de H_2O_2 0,1 M en tampón cítrico-citrato, pH = 5,55, mediante la dilución apropiada de la disolución de H_2O_2 comercial utilizada y que había sido valorada según se ha comentado anteriormente.

Los patrones a utilizar son disoluciones de 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 y 0,5 mM de H_2O_2 , de los que se preparan 100 cm^3 también en tampón cítrico-citrato, y que se obtienen, respectivamente, tomando 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 y 0,5 ml de la disolución madre de H_2O_2 .

También se preparan 100 cm^3 de glucosa 0,1 M en buffer y por último 100 cm^3 del mismo buffer para los blancos.

La recta de calibrado o recta patrón se obtenía del siguiente modo:

Se toman 2,0 ml del patrón elegido y se le añaden 2,0 ml de glucosa 0,1 M. La temperatura de la mezcla era de 25 °C. A continuación se añaden 2,0 ml de $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ y se mide la absorbancia a 415 nm frente al blanco (preparado de la misma manera pero sustituyendo los 2,0 ml del patrón por la misma cantidad de buffer cítrico-citrato), en un espectrofotómetro con cubetas de 1 cm de paso. Se debe hacer notar que para realizar la medida de la absorbancia, A, se deben esperar, una vez añadido el $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$, 20 minutos, tiempo suficiente como para que se estabilice el color.

En la tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos, y por regresión lineal:

$$A = - 0,0078 + 0,1252 \mu\text{moles H}_2\text{O}_2, \quad r^2 = 0,9991 \quad [3.4]$$

Teniendo en cuenta que la curva de calibrado se ha calculado con un volumen total de 6 ml, el nuevo valor de la pendiente, p' , será:

$$p' = 0,1252 \cdot 6 = 0,7512 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad [3.5]$$

TABLA 3.1

Recta de calibrado

<u>$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$</u>	<u>A</u>
1	0,122
2	0,237
3	0,363
4	0,501
5	0,616

c.- Ensayo de actividad

Para la realización de este ensayo se utilizó una concentración de glucosa oxidasa, [GO], de 5 g/L en tampón cítrico-citrato, también $\text{pH} = 5,55$.

El procedimiento de trabajo era el siguiente:

Se añaden $x \mu\text{l}$ de enzima a 4,0 ml de glucosa 0,1 M, en el mismo tampón, saturados de O_2 (para ello se introducían en un baño a 25°C y se hacía pasar por ellos una corriente gaseosa de

O₂ puro durante 30 minutos), al cabo de 30 segundos se añaden 2,0 ml de Ti(SO₄)₂. La absorbancia se mide a 415 nm frente a un blanco preparado de igual modo pero añadiendo antes el sulfato de titanio y después la enzima. La lectura se realiza también transcurridos 20 minutos.

Los resultados obtenidos se han recogido en la tabla 3.2, y se han sometido a un proceso de regresión lineal en el que se ha obtenido

$$A = - 0,0011 + 1,8047 [GO]_F, \quad r^2 = 0.9998 \quad [3.6]$$

TABLA 3.2

Ensayo de actividad

<u>μl enzima</u>	<u>V_F, ml</u>	<u>[GO]_F, g/L</u>	<u>A</u>
50	6,05	0,0413	0,075
100	6,10	0,0820	0,145
150	6,15	0,1220	0,219
200	6,20	0,1613	0,289
250	6,25	0,2000	0,361

d.- Obtención de la recta U.E frente a *Genzima*

Teniendo en cuenta que el ensayo de actividad se ha realizado considerando 30 segundos (tiempo que se esperó hasta añadir el sulfato de titanio), en estas condiciones 1 U.E equivaldrá a 1/2 μmol de H₂O₂.

Conociendo las absorbancias en el ensayo de actividad se puede calcular, apoyándose en la recta de calibrado, los μmoles de H₂O₂ producidos. Se debe tener en cuenta que la recta de

calibrado se ha obtenido para un volumen de 6 ml y en el ensayo de actividad es V_F ; por tanto

$$\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 = \left[\begin{array}{l} \mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ en 1a} \\ \text{curva de calibrado} \end{array} \right] = \frac{V_F}{6} \quad [3.7]$$

$$\text{U.E.} = 2 \mu\text{moles H}_2\text{O}_2 \quad [3.8]$$

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 3.3.

TABLA 3.3

Determinación de la relación entre U.E y genzima

<u>[GO]_F, g/L</u>	<u>Genzima 10⁴</u>	<u>A</u>	<u>μmoles H₂O₂</u>	<u>U.E</u>
0,0413	2,5	0,075	0,6669	1,33
0,0820	5,0	0,145	1,2408	2,48
0,1220	7,5	0,219	1,8568	3,71
0,1613	10,0	0,289	2,4496	4,90
0,2000	12,5	0,361	3,0684	6,14

que despreciando el primer punto, en el que la absorbancia leída tiene mayor error conduce a

$$\frac{\text{U.E}}{\text{Genzima}} = 4930 \pm 30 \quad [3.9]$$

En este procedimiento de medida de la actividad enzimática se ha modificado el propuesto por Pifferi y col. (1981), tomando 4 mL de glucosa 0,1 M y saturando con oxígeno puro a 25 °C (en el trabajo indicado se tomaban 2 mL y se saturaba con aire), de esta forma pueden disolverse del orden de 4 μmoles de O₂ y se está más

seguro de que la medida realizada no está limitada por el oxígeno disponible.

3.2. CARACTERISTICAS DE LOS ELECTRODOS

Hasta aproximadamente el año 1956, el sensor de O_2 era un simple alambre o disco de platino descubierto que se situaba sobre el tejido bajo estudio o inmerso en dicho tejido o en la solución. El electrodo de referencia era de calomelanos o alambre de plata situado cerca del electrodo de O_2 en el tejido o solución, Fatt (1982).

Lo primero que se observó fue la fluctuación de la lectura del electrodo debido a que la corriente recibida por el aparato no era constante. Tal comportamiento podría deberse a los efectos venenosos de los materiales biológicos adsorbidos sobre la superficie del sensor.

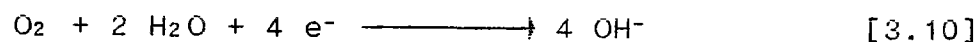
La solución encontrada por los primeros investigadores fue el recubrimiento del alambre con una delgada capa de un material permeable al oxígeno y a los pequeños iones, pero que protegían al alambre de las grandes moléculas orgánicas probablemente las que se adhieren y constituyen el veneno de la superficie. El primer material utilizado fue el "collodion". El recubrimiento, por otra parte, era frágil y tendía a desgastarse con el uso. El espesor de la membrana tampoco podía ser fácilmente controlado, y por tanto la sensibilidad del sensor era impredecible; también se debe comentar que la característica principal del material de la membrana debe ser su permeabilidad a los iones, ya que una membrana impermeable puede aislar eléctricamente el cátodo de oxígeno del electrodo de referencia y de esta manera romper el necesario circuito eléctrico entre cátodo y ánodo.

La primera descripción del sensor de O₂ recubierto con membrana fue dado por Clark en 1956, siendo la base de partida para los modernos sensores. El diseño de Clark era miniaturizado por Beebe y Liston en 1963 de tal modo que el sensor podía hacerse en forma de aguja.

A pesar de los problemas comentados, actualmente el electrodo de oxígeno se utiliza para calcular parámetros de interés, como por ejemplo la capacidad de aireación de fermentadores, por su rápida respuesta; intentando los modelos matemáticos empleados determinar el tiempo necesario para que el sensor alcance el estado estacionario y la influencia de dicho sensor en el medio que le rodea.

3.2.1. DINAMICA DEL ELECTRODO DE OXIGENO

La medida de la cantidad de oxígeno disuelto realizada por una sonda está basada en la reacción electroquímica de reducción del oxígeno



Teniendo en cuenta que el oxígeno es suministrado al reactor tipo tanque agitado mediante una corriente gaseosa, el oxígeno tendrá que transferirse desde dicha corriente hasta el cátodo de la sonda, donde tendrá lugar la reacción descrita.

Asumiendo que el grado de agitación es suficiente como para permitir las condiciones de mezcla perfecta de las fases gas y líquida, el proceso físico involucrado queda esquematizado en la figura 3.2.

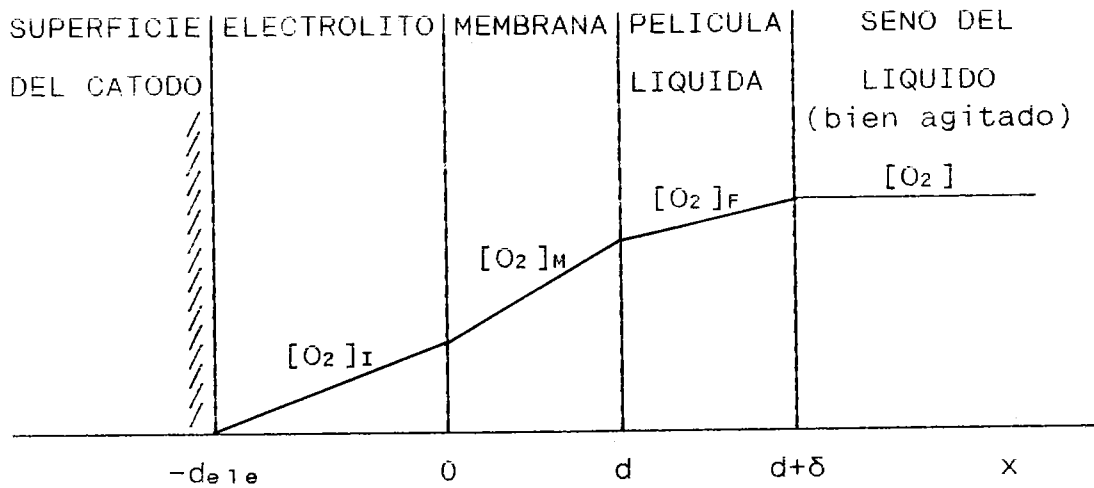


Figura 3.2. Resistencias para la transferencia de O_2 , desde el seno del líquido hasta el cátodo.

Admitiendo transporte molecular del oxígeno, el flujo de éste hacia el cátodo, a través de la membrana, vendrá dado por la primera ley de Fick

$$N_{O_2} = D_M \left[\frac{d[O_2]}{dx} \right]_{x=0} \quad [3.11]$$

donde D_M representa la difusividad de oxígeno a través de la membrana.

La presencia de estas resistencias es la causante, en un sistema que evoluciona rápidamente, del desfase existente entre los valores medidos de $[O_2]$ y los existentes en el seno del líquido, es decir, del retraso en la respuesta del electrodo.

Evidentemente la resolución de un sistema de ecuaciones en el que intervengan todas las resistencias comentadas, con sus correspondientes condiciones límites, añade una complejidad tal al problema de cálculo que hace que la mayoría de los autores propongan modelos más o menos simples que reducen el tratamiento matemático y explican aceptablemente los resultados experimenta-

les obtenidos.

Se ha demostrado, Aiba y col. (1968), que la reacción electroquímica representada por [3.10], en la superficie del cátodo, es lo suficientemente rápida como para considerar esta resistencia nula, hecho que ha sido aceptado por los investigadores posteriores.

También conviene indicar que otra simplificación generalmente admitida es la escasa influencia de la fase gaseosa en el proceso de transferencia, al considerarse dispositivos perfectamente mezclados, y dada la escasa solubilidad del oxígeno.

Como consecuencia de todo lo expuesto hasta ahora el modelo generalmente estudiado, con diversas condiciones límites, es el conocido como modelo de dos capas, es decir, considera las resistencias de la membrana y de la película líquida; y a veces el modelo de tres capas, que incluye además la resistencia del electrolito, aunque normalmente es aceptado en Bibliografía que la resistencia ofrecida por la capa de electrolito es despreciable para la mayor parte de las sondas, Linek y col. (1983), debido al pequeño espesor de la misma, por estar el cátodo muy próximo a la membrana. Sin embargo existen autores que tienen en cuenta además otras variables implicadas en el proceso de transferencia.

La interacción entre la sonda y las burbujas de gas, Votruba y Sobotka (1976), Votruba y col. (1977), Linek y Vacek (1977), también denominado efecto "hold-up", tiene influencia en las lecturas del electrodo al estar éste inmerso en una corriente dispersa gas-líquido de tal modo que la superficie externa de la membrana del electrodo está alternativamente expuesta a la concentración de oxígeno disuelta en la fase líquida, $[O_2]$, y a la concentración de equilibrio, $[O_2]_i$, en la interfase líquido-burbuja o membrana-burbuja; esto implica que la lectura del elec-

trodo va a depender de la posición de éste en el aparato, Votruba y col. (1978), y también del tamaño del cátodo, siendo más sensible una sonda pequeña que una grande por tener ésta una mayor capacidad de integración. Linek y col. (1978) estudian, además del efecto "hold-up", el efecto de la dispersión axial tanto de la fase gaseosa como líquida.

Dunn y Einsele (1975) y Dang y col. (1977), estudian el efecto de la dinámica de la fase gaseosa que se origina como consecuencia de la sustitución de una corriente de aire (O_2) por otra de N_2 o viceversa, sin interrupción de la velocidad de flujo del gas ni de la agitación.

Linek y Vacek (1977), tienen en cuenta el periodo "star-up", o tiempo que debe transcurrir hasta que se establezca el nuevo nivel de concentración de O_2 ante un impulso en escalón y/o hasta que el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, $k_L a$, alcance su valor de estado estacionario, después de abrir el suministro del gas al reactor.

También se ha observado, Benedek y Heideger (1970), Koc y Zajic (1975) y Linek y Benes (1977 y 1978), que un modelo simple de difusión en la membrana y capa de electrolito es insuficiente para describir el retraso durante el último 10 % - 20 % de la respuesta del electrodo a un cambio de concentración de oxígeno en forma de impulso en escalón. Este retraso es causado, probablemente, por una difusión lateral significativa de O_2 hacia el cátodo, como consecuencia de que el espesor de la membrana y de la capa de electrolito no es constante sobre el área del cátodo. Este problema es abordado por los modelos de multirregión.

A continuación se comenta más detenidamente la resistencia ofrecida por la membrana del electrodo, por ser considerada por la mayoría de los autores como la de mayor importancia en el

proceso de transferencia y por ser una de las características más importantes del electrodo. Esta resistencia ha sido explicada mediante modelos de difusión y semiempíricos.

a.- Modelos de difusión en la membrana

La corriente que llega al electrodo, en el estado estacionario, es proporcional a la concentración de oxígeno en la superficie externa de la membrana; asumiéndose en estos modelos que la curva de respuesta sigmoideal del electrodo puede ser explicada suponiendo difusión molecular del O_2 , a través de la membrana y capa de electrolito hacia el cátodo, y que es cuantificada por la 2ª ley de Fick

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 [O_2]}{\partial x^2} \quad [3.12]$$

Esta ecuación puede integrarse especificando dos condiciones límites, utilizándose generalmente las siguientes:

$$[O_2] = 0 \text{ para } x = 0 \quad [3.13]$$

$$[O_2] = [O_2]_M \text{ para } x = d \quad [3.14]$$

que conduce a la siguiente relación

$$[O_2] = [O_2]_M x/d \quad [3.15]$$

Estos modelos se completan con la consideración de las demás resistencias que intervienen en el proceso de transferencia y han sido utilizados por distintos autores, Heineken (1970 y 1971),

Linek (1972), Linek y col. (1973), Linek y Benes (1977), Linek y Vacek (1977), Votruba y col. (1977), Linek y Benes (1978), Lundsgaard y col. (1978), Linek y Sinkule (1983) y Linek y col. (1989), con diferentes condiciones de contorno.

Las soluciones de estos modelos de difusión conducen a similares formulaciones de la respuesta normalizada de la sonda para experimentos dinámicos de aireación, Y_P , así Linek y col. (1973) obtienen

$$Y_P = 1 - \frac{\pi B^{\frac{1}{2}}}{\sin(\pi B^{\frac{1}{2}})} \exp(-B k_D t) - 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp \frac{-\pi^2 k_D t}{\pi^2 / (B - 1)} \quad [3.16]$$

donde

$$Y_P = \frac{[O_2]_i - [O_2]}{[O_2]_i - [O_2]_0} \quad [3.17]$$

$$B = \frac{k_L \cdot a}{k_D} \quad [3.18]$$

$$k_D = \pi^2 \frac{D_M}{d^2} \quad [3.19]$$

El parámetro k_D es una constante de difusión de la sonda y está relacionado, como se indica en la ecuación [3.19], con el coeficiente de difusión, D_M , y el espesor de la membrana, d . Este parámetro es dimensionalmente equivalente a la constante de tiempo de la sonda, k_{e1} , derivada de consideraciones empíricas. La ecuación [3.16] se puede simplificar para $k_D t > 3$, ya que en estas condiciones, Linek (1972) y Linek y col. (1973), el sumatorio se puede despreciar y reordenando dicha expresión se obtendrá:

$$\ln(1 - Y_p) = - k_L \cdot a \cdot t + \ln \frac{\pi B^{\frac{1}{2}}}{\sin(\pi B^{\frac{1}{2}})} \quad [3.20]$$

expresión que permite calcular $k_L \cdot a$ a partir de una representación o regresión lineal de $\ln(1 - Y_p)$ frente a t . En los restantes casos es necesario someter al electrodo a un impulso en escalón para determinar la constante k_D del electrodo.

La respuesta a un impulso en escalón ha sido analizada por todos los autores que utilizan modelos de difusión. Heineken (1970 y 1971) y Linek y col. (1973) obtienen que:

$$Y_p' = 1 - 2 \exp(-k_D t) + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-n^2 k_D t) \quad [3.21]$$

El sumatorio que aparece en esta expresión puede despreciarse cuando $Y_p' \geq 0,4$ o $k_D t \geq 1,2$, ya que en estas condiciones alcanza como máximo un 3 % del total y por tanto k_D puede estimarse a partir de una representación o regresión lineal de $\ln(1 - Y_p)$ frente a t .

Votruba y col. (1977), mediante un análisis de momentos han descrito la constante k_D como

$$k_D = \frac{\pi^2}{6 a_s} \quad [3.22]$$

donde a_s representa el área por encima de la respuesta normalizada de la sonda a un impulso en escalón, figura 3.3. Este método es muy conveniente y rápido, ya que la constante es evaluada teniendo en cuenta todos los datos de concentración de oxígeno frente al tiempo y ofrece prácticamente idénticos valores que el método numérico anterior.

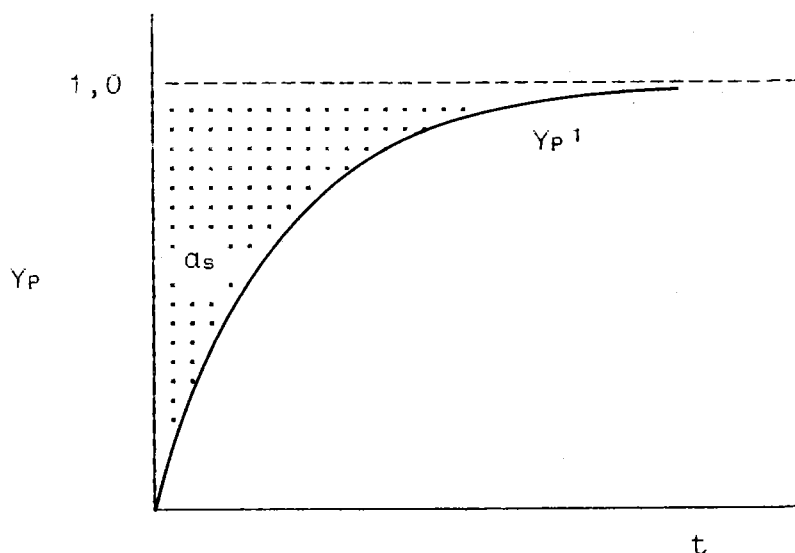


Figura 3.3. Método de los momentos para la determinación de la constante k_D del electrodo.

La constante k_D de la sonda varía con la temperatura cumpliendo la ecuación de Arrhenius, con una energía de activación que oscila entre 3 - 4 J/mol; debido a esta dependencia se deberá medir el valor de k_D a la misma temperatura a la que se vaya a realizar el experimento de aireación.

b.- Modelos semiempíricos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el uso de los modelos anteriores, han sido numerosos los autores que han supuesto que la respuesta del electrodo puede ajustarse a una cinética de primer orden, Aiba y Huang (1969), Fuchs y col. (1971), Dunn y Einsele (1975), Votruba y Sobotka (1976), Ruchti y col. (1981) y Vardar y Lilly (1982). Otros autores, como Prokop y col. (1975) y Dang y col. (1977), aceptan que dicha respuesta puede ser interpretada mediante dos reacciones en serie de primer orden, es decir, equivalente a una cinética de segundo orden, algo que parece cumplirse para líquidos viscosos.

Admitiendo, como es habitual una cinética de primer orden, la respuesta del electrodo vendrá dada por

$$\frac{dY_P}{dt} = k_{e1} (Y_L - Y_P) = \frac{Y_L - Y_P}{\tau_{e1}} \quad [3.23]$$

que combinada con la ecuación de transferencia de masa, escrita en forma adimensional,

$$\frac{dY_P}{dt} = -k_L \cdot a \cdot Y_L \quad [3.24]$$

y con las correspondientes condiciones iniciales

$$t = 0 \quad Y_P = 1 \quad Y_L = 1 \quad [3.25]$$

puede integrarse, obteniéndose el resultado siguiente:

$$Y_P = \frac{1}{k_{e1} - k_L \cdot a} [k_{e1} \exp(-k_L \cdot a \cdot t) - k_L \cdot a \exp(-k_{e1} \cdot t)] \quad [3.26]$$

donde τ_{e1} es el tiempo de respuesta de la sonda y cuya relación con la constante de tiempo de la misma, k_{e1} , viene dada por la siguiente ecuación

$$\tau_{e1} = \frac{1}{k_{e1}} \quad [3.27]$$

En general k_{e1} y τ_{e1} son constantes equivalentes que es necesario determinar experimentalmente, como en el caso anterior, sometiendo al electrodo a un cambio brusco de concentración

(respuesta en escalón), figura 3.4, calculándose k_{e1} o τ_{e1} cuando se alcance el 63,2 % de la respuesta total.

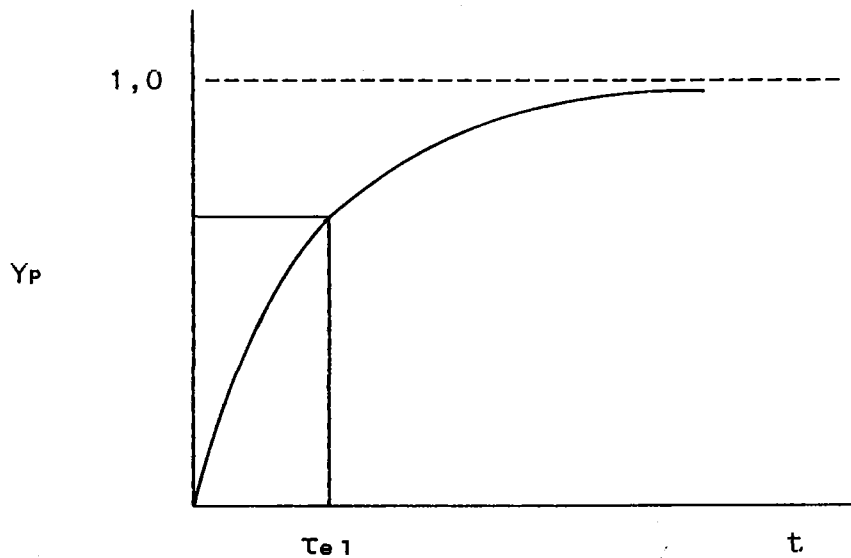


Figura 3.4. Determinación de la constante de tiempo, τ_{e1} , del electrodo.

Conocido τ_{e1} , $k_{L.a}$ se puede estimar mediante regresión no lineal de la ecuación [3.26].

Dang y col. (1977) determinan el valor de $k_{L.a}$ mediante el método de los momentos, por medida gráfica del área sobre la curva de respuesta normalizada del electrodo frente al tiempo, figura 3.3.

Por último indicar que teóricamente se demuestra que para obtener una suficiente exactitud en la medida del valor de $k_{L.a}$, éste debe ser inferior a la inversa del tiempo de respuesta del electrodo, es decir

$$k_{L.a} < \frac{1}{\tau_{e1}} \quad [3.28]$$

3.3. CALCULO DE LAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

3.3.1. SOLUBILIDAD DEL OXIGENO EN LA FASE LIQUIDA

Dada la pequeña solubilidad del oxígeno en disoluciones acuosas, se acepta generalmente que la resistencia opuesta por la fase gaseosa a su transferencia es despreciable, incluso cuando se utiliza aire; Hikita y col. (1980) estiman, para un aparato semejante al utilizado en esta investigación, que la resistencia opuesta a la transferencia de oxígeno desde una masa de aire representa menos del 0,01 % de la resistencia total.

Dado que se usa oxígeno puro, saturado con respecto a la fase líquida, en la mayoría de los experimentos del presente trabajo, y solamente en algunos se utiliza mezclas oxígeno-nitrógeno, siendo la proporción de oxígeno en el caso extremo aproximadamente la misma que la existente en el aire, esta hipótesis está totalmente justificada en este caso, por lo que se considerará que no existen gradientes de concentración en la fase gaseosa.

Se admitirá también la hipótesis usual en los estudios de transferencia de materia gas-líquido de que la interfase se encuentra en equilibrio.

En estas condiciones es aplicable la ley de Henry para obtener la concentración de oxígeno en la interfase

$$[O_2]_i = \frac{P_{O_2}}{H_d} \quad [3.29]$$

donde P_{O_2} representa la presión parcial del oxígeno en la fase gaseosa y H_d la constante de la Ley de Henry, función de la temperatura y composición de la fase líquida.

a.- Presión parcial del oxígeno en la fase gaseosa

Puesto que la fase gaseosa está siempre saturada con respecto a la fase líquida, la presión parcial del O_2 estará relacionada con la presión total del sistema, P_T , la presión de vapor de la disolución, P_v , a la temperatura de trabajo y la fracción de oxígeno en la mezcla oxígeno-nitrógeno, y_{O_2} , en la forma:

$$P_{O_2} = y_{O_2} (P_T - P_v) \quad [3.30]$$

Cuando se utiliza oxígeno puro, y_{O_2} tendrá el valor unidad y por tanto la anterior ecuación se reduce a

$$P_{O_2} = P_T - P_v \quad [3.31]$$

Debe observarse que para calcular P_{O_2} a partir de la ecuación [3.30], el único dato que se deberá estimar será el de la presión de vapor de la disolución, al ser la presión total uno de los datos primarios medidos en cada experimento e y_{O_2} viene impuesto en cada uno de ellos.

En el presente trabajo se ha estimado que la disolución podría considerarse como agua pura por las pequeñas concentraciones de los solutos y su escasa contribución a dicha presión de vapor.

Datos de la presión de vapor del agua pura en función de la temperatura se encuentran en el "Perry's Chemical Engineers' Handbook" de Perry y Green, 3-45 (1984), y que quedan reflejados en la tabla 3.4, donde se han recogido las temperaturas utilizadas en esta investigación.

TABLA 3.4

Presión de vapor del agua pura

<u>T, °C</u>	<u>P_v, mm Hg</u>
25	23,8
30	31,8
35	42,2
40	55,3
45	71,9
50	92,5

b.- Estimación de la constante de la ley de Henry

Una vez determinada la presión parcial de oxígeno, para el cálculo de la concentración de oxígeno en la interfase, según la ecuación [3.29], será necesario estimar el valor de la constante de la ley de Henry, H_d .

En bibliografía puede encontrarse fácilmente datos sobre la solubilidad del oxígeno en agua pura en función de la temperatura, si bien a veces es necesario realizar transformaciones de unidades para expresarlos en los valores de la constante de la ley de Henry para el agua pura, H_0 . En el presente trabajo se expresa el valor de H_0 en mm Hg/(mol/L).

En "International Critical Tables" , Vol. III, 271 (1928), se encuentran datos de solubilidad del oxígeno en agua para una presión parcial de oxígeno de 1 atm, que puede transformarse mediante la ecuación [3.29] en los valores de H_0 .

Por otra parte, Battino y Clever (1966) han revisado la mayor parte de los datos experimentales de solubilidad del oxígeno en agua publicados, expresándolos como coeficiente Bunsen, α , que

se define como el volumen de oxígeno en condiciones normales que es absorbido por la unidad de volumen de disolvente a la temperatura considerada y a 760 mm Hg de presión parcial del oxígeno, siendo su relación con H_0

$$H_0 = \frac{17033}{\alpha} \quad [3.32]$$

Por último indicar que en el ya citado "Perry's Chemical Engineers' Handbook", 3-103, se encuentran datos de solubilidad del oxígeno en agua pura, en forma de la constante de la ley de Henry expresada en atm/(mol soluto/mol solución), H . Estos datos pueden también transformarse a H_0 con las unidades ya comentadas, despreciando la concentración de oxígeno frente a la del agua, mediante la ecuación

$$H_0 = \frac{760 H}{55,55} = 13,68 H \quad [3.33]$$

En la tabla 3.5, se indican los datos de solubilidad del oxígeno en agua pura obtenidos de las diversas fuentes, observándose que la coincidencia entre ellos es aceptable, sin embargo se han utilizado los datos encontrados en el "Perry's Chemical Engineers' Handbook" por ser más recientes y por incluir todos los valores de temperatura utilizados en esta investigación.

La disminución de la solubilidad del oxígeno por efecto salino, debido a los electrolitos presentes en la disolución, puede ser descrita por la ecuación empírica de Sechenov

$$\log(H_c/H_0) = k_s c \quad [3.34]$$

TABLA 3.5

Solubilidad del oxígeno en agua pura

T, °C	$\alpha \cdot 10^3$ (a)	Valores de $H_o \cdot 10^{-5}$, mm Hg/(molg/L)		
		(b)	(c)	(d)
20	31,01±0,28	5,51	5,49	5,49
25	28,43±0,23	6,03	5,99	6,99
30	26,30±0,22	6,55	6,50	6,48
35	24,63±0,24	6,97	6,94	6,92
40	24,16±0,17	7,38	7,32	7,35
45	-----	--	7,70	--
50	20,85±0,13	--	8,04	8,17

(a) Coeficiente de Bunsen, valores medios de los recogidos por Battino y Clever (1966)

(b) International Critical Tables, Vol. III, 271 (1928)

(c) Perry's Chemical Engineers' Handbook (1984)

(d) Calculados a partir de (a) mediante la ecuación [3.33]

siendo H_c la constante de la ley de Henry para una disolución acuosa de concentración c molar del electrolito considerado y k_s la llamada constante de Sechenov, que depende de la temperatura y de la naturaleza del gas y del electrolito.

Una modificación de la ecuación [3.34] ha sido propuesta por van Krevelen y Hoftijzer (1948)

$$\log(H_c/H_0) = h I \quad [3.35]$$

donde I es la fuerza iónica de la disolución

$$I = \frac{1}{2} (z_+^2 c_+ + z_-^2 c_-) \quad [3.36]$$

y descompone la constante h en la contribución del catión, del anión y el gas

$$h = h_+ + h_- + h_g \quad [3.37]$$

En este método, que ha sido ampliamente utilizado por Danckwerts (1970), Onda y col. (1970) y Charpentier (1981), publicándose numerosos valores de h_+ , h_- y h_g . La influencia de la temperatura suele incluirse en la contribución del gas, h_g , generalizándose la ecuación [3.35], para electrolitos mezclados, en la forma

$$\log(H_d/H_0) = h_1 I_1 + h_2 I_2 + \dots = \sum_i h_i I_i \quad [3.38]$$

No obstante algunos investigadores, Schumpe y col. (1978), Schumpe y Deckwer (1979) y Quicker y col. (1981), encuentran el

modelo anterior inconsistente, pues conduce a valores distintos de la solubilidad para disoluciones que son totalmente equivalentes desde el punto de vista iónico, dependiendo de como se prepare el sumatorio de la ecuación [3.38], debido a que al multiplicar el parámetro específico de cada ión por la fuerza iónica de la sal correspondiente, se hace depender el efecto salino de un ión de la valencia de su ión contrario en la sal.

Debido a esto, estos autores proponen modificar la ecuación [3.38] en la forma

$$\log(H_d/H_0) = \sum_i h_i I_i \quad [3.39]$$

siendo I_i , la fuerza iónica atribuible a cada ión

$$I_i = \frac{1}{2} (z_i^2 c_i) \quad [3.40]$$

y h_i un parámetro dependiente de la naturaleza del ión, del gas y de la temperatura, si bien estos autores encuentran que h_i es prácticamente independiente de la temperatura en el intervalo de 10 a 40 °C.

Se han realizado trabajos comparando los métodos de Danckwerts, Charpentier y Schumpe, entre ellos uno de los más recientes por Páez Dueñas (1982) y que destaca por ser bastante extenso. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el método de Schumpe se acerca más a los valores experimentales, mostrándose más consistente sobre todo en lo referente a la variación de la solubilidad con la temperatura.

Por todo lo expuesto y considerando que los experimentos se han realizado entre 25 °C y 50 °C, se decidió utilizar el método de Schumpe a lo largo de toda la investigación, por su mayor

consistencia interna y por el hecho de que al representar mejor la variación del efecto salino con la temperatura, el error cometido será menor, ya que todos los métodos se basan en datos experimentales a 25 °C.

En la tabla 3.6 aparecen los datos de h_i utilizados y que han sido tomados de Schumpe y col. (1982)

TABLA 3.6

Constantes de efecto salino, h_i

<u>Ión</u>	<u>h_i, M^{-1}</u>
K ⁺	-0,587
HPO ₄ ⁼	0,477

Por último indicar que la presencia de sustancias orgánicas (moleculares), generalmente disminuye la solubilidad del gas en las disoluciones acuosas, aunque existen algunas, como alcoholes de pequeña cadena, que pueden incrementar dicha solubilidad.

Los efectos de estos solutos orgánicos puede describirse análogamente por una ecuación tipo Sechenov

$$\log(H_d/H_0) = \sum_i k_i c_i \quad [3.41]$$

donde c_i es la concentración molar de la sustancia orgánica y k_i una constante específica de la sustancia i y que depende del gas y en menor medida de la temperatura.

En algunos casos se encuentra una mejor correlación de los datos experimentales con una relación lineal del tipo

$$\frac{H_o}{H_d} = 1 - \sum_i m_i c_i \quad [3.42]$$

Para rangos mayores de concentración pueden necesitarse modelos con dos parámetros, o incluso puede no existir una relación simple en todo el rango. A diferencia de lo que ocurre con el efecto salino, no hay modelos empíricos para predecir los valores de k_o o m_i .

En bibliografía se encuentran trabajos en donde se pueden encontrar datos de solubilidad en disoluciones de diversos azúcares y sustancias moleculares utilizadas en biomedios, Hikita y col. (1978), Quicker y col. (1981); pero, se seguirán utilizando los datos de Schumpe y col. (1982), que han sido revisados y ampliados por Kutsche y col. (1984), por ser más recientes y para asegurar la consistencia de los resultados obtenidos.

En la tabla 3.7 se recogen los datos de k_i las sustancias moleculares utilizadas en la presente investigación, indicando que el valor referente a la alanina, al no disponerse de datos al respecto, se ha tomado del correspondiente a la glicina por su semejante tamaño molecular.

TABLA 3.7

Constantes de efecto molecular, k_i

<u>Sustancia</u>	<u>Rango de concentración, g/L</u>	<u>k_i, M⁻¹</u>
Acido cítrico	0 - 200	0,09779
Glucosa	0 - 450	0,11855
Alanina	0 - 200	0,09345

Resumiendo, para calcular la solubilidad del oxígeno en disolución habrá que tener en cuenta la presencia de electrolitos

y solutos orgánicos, y según se desprende de lo expuesto en este apartado, dicho cálculo puede realizarse aplicando la siguiente ecuación empírica

$$\log(H_d/H_o) = \sum_i h_i I_i + \sum_j k_j c_j \quad [3.43]$$

3.3.2. DIFUSIVIDAD DEL OXIGENO EN LA FASE LIQUIDA

En los procesos de absorción con reacción química es necesario utilizar expresiones y módulos adimensionales, que dependen de la difusividad del soluto gaseoso, para el tratamiento matemático de los datos obtenidos; así por ejemplo en el régimen de reacción rápida de pseudo-primer-orden la velocidad de absorción de O₂ es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la difusividad de este en la fase líquida.

Por tanto será necesario determinar ó estimar la difusividad del oxígeno en la disolución utilizada.

a.- Difusividad del oxígeno en agua

La ecuación de Stokes-Einstein prevé para moléculas esféricas que se difunden a través de un medio continuo, una expresión para la difusividad del tipo

$$D = \frac{K T}{6 \pi \mu r} \quad [3.44]$$

donde K es una constante, T la temperatura en K, μ la viscosidad del líquido en cp y r el radio de la molécula que se difunde en cm.

Reordenando la ecuación [3.44] se llega a

$$\frac{D \mu}{T} = \frac{K}{6 \pi r} \quad [3.45]$$

que como puede apreciarse, para un gas dado, $D \mu/T$, sería una constante al serlo el segundo término.

Con ayuda de la expresión [3.45] se pueden calcular los valores de la difusividad del oxígeno a las temperaturas utilizadas en la presente investigación, a partir de los datos experimentales encontrados en bibliografía. Se debe hacer constar que dichos datos se reducen, por desgracia, al intervalo de temperaturas de 15 a 25 °C, y se han recogido en la tabla 3.8, así como los valores calculados mediante [3.45].

TABLA 3.8

Difusividades del oxígeno en agua
(experimentales)

T, °C	D 10 ⁵ cm ² /s	D μ/T 10 ⁸ cm ² cp/(s K)	Referencia
20	2,27	7,76	Linek y col (1970)
22	2,40	7,76	de Waal y Okeson
25	2,41	7,20	Vivian y King (1964)
15	1,67	6,60	Himmelblau (1964)
16	1,87	7,17	"
18,2	1,99	7,16	"
20	2,01	6,87	"
22	2,25	7,28	"
22	2,22	7,18	"

Como se ha comentado $D \mu/T$ debería permanecer prácticamente constante por lo que promediando los valores calculados se obtiene:

$$\frac{D \mu}{T} = 7,22 \cdot 10^{-8} \frac{\text{cm}^2 \text{ cp}}{\text{s K}} \quad [3.46]$$

ecuación que permite calcular los valores de la difusividad del oxígeno en agua pura conocida la temperatura y la viscosidad, y que quedan reflejados en la tabla 3.9.

TABLA 3.9

Difusividades del oxígeno en agua
(calculadas)

<u>T, °C</u>	<u>μ, cp</u>	<u>D 10⁵, cm²/s</u>
20	1,0020	2,11
25	0,8904	2,42
30	0,7975	2,74
35	0,7174	3,09
40	0,6529	3,46
45	0,5960	3,85
50	0,5468	4,27

b.- Difusividad del oxígeno en disoluciones de electrolitos y sustancias moleculares

En las condiciones normales de experimentación, es decir alejados de la dilución infinita y utilizando electrolitos mixtos, es necesario recurrir a expresiones empíricas para estimar valores de difusividad.

Ratcliff y Holdcroft (1963), a partir de la teoría de Eyring para el estado líquido y mediante ciertas aproximaciones proponen la expresión

$$D = D_0(1 - \epsilon c) \quad [3.47]$$

para la difusividad de un gas en la disolución de un electrolito de concentración c , siendo D_0 la difusividad en agua pura y ϵ una constante.

La constante ϵ es una propiedad aproximadamente aditiva de los iones presentes y prácticamente independiente de la temperatura y de la naturaleza del soluto que se difunde, Gubbins y col. (1966), y puede ser calculada, según proponen los primeros autores citados, mediante la ecuación

$$\epsilon = 0,030 + 0,550 W \quad [3.48]$$

siendo

$$W = \frac{1}{c} \frac{\mu - \mu_0}{\mu} \quad [3.49]$$

donde μ_0 es la viscosidad del agua pura y μ es la viscosidad de la disolución de electrolito de concentración c . El valor de W podría calcularse también por suma de las contribuciones de los iones correspondientes al electrolito, Bingham (1941)

$$W = W_+ + W_- \quad [3.50]$$

Para disoluciones constituidas por electrolitos mezclados se podría utilizar la ecuación [3.48] pero ampliada según proponen

Hikita y col. (1979).

$$D = D_0 \left[1 - \sum_i \epsilon_i c_i \right] \quad [3.51]$$

donde las constantes ϵ_i para cada electrolito se calculan por [3.48], [3.49] ó [3.50]

Hikita y col. (1979 y 1980) dan valores de ϵ basados en medidas directas de viscosidad con los electrolitos considerados, algo que parece bastante conveniente.

Normalmente no es fácil encontrar en bibliografía los datos de μ para todos los electrolitos utilizados en los trabajos de investigación, existiendo otras correlaciones empíricas de más fácil aplicación y que explican los resultados experimentales con aceptable exactitud. Entre ellas cabe destacar la que a continuación se describe y que es aplicable tanto a disoluciones con electrolitos simples como mezclados, Ju y Ho (1985).

Estos autores utilizan un electrodo de oxígeno para la medida de la difusividad del O_2 , método ya utilizado por Akita (1981), y encuentran la siguiente expresión

$$D = D_0 [(1 - f(I))^{1/2}] \quad [3.52]$$

donde I representa la fuerza iónica total de la disolución y que se calcula, por generalización de la ecuación [3.36], de la siguiente manera

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i c_i \quad [3.53]$$

y f es un factor que depende de la naturaleza de los electroli-

tos presentes en la disolución, pero que puede ser relacionado con el grupo (M/β) , Ju y col. (1986), mediante la expresión

$$f = A (M/\beta)^n \quad [3.54]$$

siendo $A = 0,1187 [L^2/(g.mol)]^{1/4}$ y $n = 1/4$, ambos determinados empíricamente. Para soluciones de electrolitos simples, M es el peso molecular de la sal presente, y el parámetro β es la relación entre la fuerza iónica total de la disolución y la concentración molar de la sal en la disolución, C_s , es decir

$$\beta = I/C_s \quad [3.55]$$

Por ejemplo para el electrolito K_2HPO_4 , presente en esta investigación, el valor de M es 174,18 g y se obtendrían los siguiente valores

$$I = \frac{1}{2} (C_s \cdot 2^2 + 2 C_s \cdot 1^2) = 3 C_s$$

$$\beta = \frac{3 C_s}{C_s} = 3$$

$$f = 0,1187 (174,18/3)^{1/4} = 0,3277 (mol/L)^{-1/2}$$

Cuando la disolución contiene mezclas de electrolitos se deberá generalizar la expresión [3.54] en la forma

$$f = A (M_s/\beta_s)^n \quad [3.56]$$

estimándose M_s , peso molecular efectivo, y β_s , parámetro de la disolución mezcla de electrolitos, con la ayuda de las siguientes

ecuaciones

$$M_s = \sum_i x_i M_i \quad [3.57]$$

$$\beta_s = \sum_i x_i \beta_i \quad [3.58]$$

donde x_i es la fracción molar de cada constituyente de la sal, y los subíndices s e i se refieren a la mezcla de sales y cada sal, respectivamente.

A título de información se puede indicar que para soluciones con fuerzas iónicas similares a las que poseen los medios normales de fermentación, se ha estimado que la aplicación de este método en el cálculo de la difusión relativa de oxígeno, D/D_0 , conduce a desviaciones inferiores a $\pm 3\%$.

Recientemente, Holtzaple y col. (1989), basándose en los datos obtenidos por Ju y Ho (1985), comparan tres modelos para el cálculo de la difusividad del O_2 en disoluciones de electrolitos: ley de Fick, actividad como fuerza impulsora y potencial químico como fuerza impulsora. Estos autores encuentran que los tres modelos no difieren significativamente en sus predicciones: menos del 5% cuando la fuerza impulsora es 8 atm; si se tiene en cuenta que en los sistemas biológicos típicos la fuerza impulsora es inferior a 0,21 atm, la elección de uno u otro método prácticamente no tendrá influencia en los valores obtenidos.

Por otra parte, Pinto y Graham (1986) han propuesto un método basado en el uso de las ecuaciones de flujo de Stefan-Maxwell para la evaluación de difusividades en disoluciones de electrolitos, teniendo en cuenta propiedades tales como la viscosidad de la disolución y la movilidad de los iones. El empleo de las ecuaciones de flujo de Stefan-Maxwell predice bien

la difusividad en electrolitos multicomponentes y altas concentraciones (hasta 4,0 M) y parece ser el método adecuado para estimar difusividades en sustancias cambiadoras de iones y membranas.

La influencia de la presencia de sustancias moleculares en los valores de la difusividad del oxígeno no ha sido tan ampliamente estudiada, concretándose los estudios al efecto de la concentración de glucosa, entre ellos Ho y col. (1986) y Ju y col. (1988) que estudian dicha influencia a 22 °C.

Existen varias teorías y correlaciones en bibliografía que sugieren que los coeficientes de difusión de un soluto son inversamente proporcional a la viscosidad del solvente a una temperatura constante, es decir

$$D \mu^n = \text{const.} \quad [3.59]$$

siendo $n = 1,0$ para la difusión de moléculas en disoluciones diluidas con un solvente de moléculas pequeñas. Esta expresión es conocida, como ya se indicó en un apartado anterior, por ecuación de Stokes-Einstein. Por otra parte, para el caso de moléculas de soluto que se difunden en soluciones viscosas de grandes moléculas, la teoría de la velocidad de Eyring predice que el coeficiente de difusión es proporcional a la viscosidad del solvente en una potencia $- 2/3$, Hiss y Cussler (1973) y Hikita y col. (1978).

Ho y col. (1986) trabajan con disoluciones diluidas de glucosa (hasta una concentración del 10 % en peso). Estos autores utilizan un viscosímetro capilar tipo Ostwald para la determinación de la viscosidad relativa de la disolución, μ/μ_0 , cuyos valores han recogido en la tabla 3.10, y un electrodo de membrana

para la determinación de los coeficientes de difusión del oxígeno.

TABLA 3.10

Viscosidad relativa de disoluciones diluidas de glucosa

<u>[G], % en peso</u>	<u>μ/μ_0</u>
0	1,000
1	1,014
3	1,040
5	1,078
7	1,115
9	1,154
10	1,174

En todos los experimentos realizados, la representación o correlación de los valores de la viscosidad relativa con los de difusividad, se ajusta aceptablemente a la ecuación

$$(D/D_0) = (\mu/\mu_0)^{-1} \quad [3.60]$$

es decir, a una ecuación del tipo Stokes-Einstein.

Los experimentos realizados por Ju y col. (1988) solamente varían en la concentración de glucosa, al trabajar éstos con disoluciones concentradas de glucosa (30 % en peso). La ecuación que ajusta correctamente los datos experimentales es ahora la siguiente

$$(D/D_0) = (\mu/\mu_0)^{-0,725} \quad [3.61]$$

Por tanto, para tener en cuenta el efecto conjunto de la presencia de glucosa y sales en el cálculo de los valores de difusividad del oxígeno, podría utilizarse

$$(D/D_0)_M = (D/D_0)_G (D/D_0)_S \quad [3.62]$$

representando los subíndices M, G y S la solución acuosa mezcla de glucosa y sales, de glucosa y de sales, respectivamente.

En el presente trabajo los experimentos se realizan con disoluciones diluidas de glucosa, por lo que para el cálculo de $(D/D_0)_G$ se deberá emplear la tabla 3.10 junto con la ecuación [3.60], y para el cálculo de $(D/D_0)_S$ la ecuación [3.52], siendo el valor de f igual a $0,3277 \text{ (mol/L)}^{-1/2}$.

3.4. DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES VOLUMETRICOS DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO

Para la determinación de los coeficientes de transferencia de O_2 , $k_L \cdot a$, se utilizó el método dinámico ya que en las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación: interfase plana y area interfacial pequeña, los errores correspondientes al efecto hold-up y al grado de mezcla de la fase gaseosa no se producen y la constante de tiempo del electrodo utilizado es apreciablemente superior a los valores de $k_L \cdot a$ determinados.

En estos experimentos se hacía circular, en primer lugar, a través del reactor N_2 puro saturado con respecto de la fase líquida y una vez alcanzado el equilibrio se sustituía instantáneamente la fase gaseosa por oxígeno puro saturado con respecto de la fase líquida y se empezaba a contar el tiempo y a anotar las lecturas del electrodo correspondientes a intervalos regulares de

tiempo. Como fase líquida se utilizaron:

- 200 cm³ de disolución de glucosa 0,1 M en tampón cítrico-fosfato de pH = 5,55 y en ausencia de las enzimas glucosa-oxidasa y catalasa, a las temperaturas de 25 y 45 °C.
- 100 cm³ de concentración 0,1 M de alanina en tampón cítrico-fosfato de pH = 7,3 y en ausencia de D-aminoácido-oxidasa y catalasa, a la temperatura de 39 °C.

En todos los casos se utilizan las mismas condiciones de agitación que en los experimentos cinéticos y un caudal de fase gaseosa de 25 L/h en las condiciones ambientes, que dado que el volumen de la fase gaseosa en el sistema era inferior a 250 cm³ determinaba un tiempo medio de residencia de 0,6 minutos, lo que aseguraba un barrido completo de la fase anterior en un par de minutos una vez producido el cambio.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se encuentran en las tablas 3.11, 3.12 y 3.13. Se indica también en estas tablas la constante de la ley de Henry y la concentración de O₂ en la fase líquida correspondiente a la saturación frente a la fase gaseosa formada por O₂ puro saturado con respecto de la fase líquida.

La constante de la ley de Henry para cada disolución y temperatura se estimó por los métodos indicados en el apartado 3.3.1 de esta Memoria; partiendo de sus valores para agua pura:

$$T = 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad H_0 = 5,99 \cdot 10^5 \frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$$

$$T = 45 \text{ } ^\circ\text{C} \quad H_0 = 7,70 \cdot 10^5 \frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$$

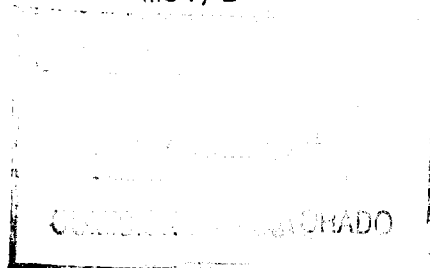


TABLA 3.11

ABSORCION FISICA DE O₂

V = 200 cm³ T = 25 °C H_d = 6,82 10⁵ $\frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$

Fase líquida: 0,1 M de glucosa en tampón de pH = 5,55

P_T = 710,4 mm Hg

P_T = 706,0 mm Hg

[O₂]* = 10,07 10⁻⁴ M

[O₂]* = 10,00 10⁻⁴ M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>	<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	20,0	0	10,0
5	33,0	5	23,0
10	44,0	10	34,0
15	52,0	15	44,0
20	58,0	20	53,0
25	63,0	25	60,0

P_T = 705,3 mm Hg

[O₂]* = 9,99 10⁻⁴ M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	6,0
5	20,0
10	32,0
15	43,0
20	52,0
25	59,0

TABLA 3.12

ABSORCION FISICA DE O₂

V = 200 cm³ T = 45 °C H_a = 8,77 10⁵ $\frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$

Fase líquida: 0,1 M de glucosa en tampón de pH = 5,55

P_T = 705,5 mm Hg

P_T = 707,2 mm Hg

[O₂]* = 7,22 10⁻⁴ M

[O₂]* = 7,24 10⁻⁴ M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>	<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	2,0	0	3,0
2	5,0	1	7,0
3	10,0	2	12,0
5	22,0	3	17,0
6	27,0	4	22,0
7	32,0	5	27,0
8	36,0	10	47,0
10	44,0	15	61,0
15	57,0		

TABLA 3.13

ABSORCION FISICA DE O₂

V = 100 cm³ T = 39 °C H_a = 8,07 · 10⁵ $\frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$

Fase líquida: 0,1 M de alanina en tampón de pH = 7,3

P_T = 706,1 mm Hg

P_T = 704,5 mm Hg

[O₂]* = 8,10 · 10⁻⁴ M

[O₂]* = 8,08 · 10⁻⁴ M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>	<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	2,0	0	2,0
1	8,0	1	8,0
2	17,0	2	18,0
3	26,0	3	28,0
4	34,0	4	37,0
5	42,0	5	45,0
6	49,0	6	51,0
7	55,0	7	56,0
8	61,0	8	62,0
9	66,0		
10	71,0		

y de los parámetros de efecto salino de los restantes componentes de la fase líquida, admitiendo que son prácticamente independientes de la temperatura:

Glucosa	$k_i = 0,11855 \text{ L/mol}$
Acido cítrico	$k_i = 0,09779 \text{ L/mol}$
HPO_4^-	$h_i = 0,477 \text{ L/mol}$
K^+	$h_i = -0,587 \text{ L/mol}$

Teniendo en cuenta las concentraciones de estos componentes en la disolución utilizada:

$$[\text{Glucosa}] = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$[\text{Acido cítrico}] = 0,0473 \text{ mol/L}$$

$$[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 0,1084 \text{ mol/L}$$

resulta:

$$\begin{aligned} \log(H_d/H_0) &= (0,477)(\frac{1}{2} 0,1084 \cdot 4) + (-0,587)(\frac{1}{2} 0,2168 \cdot 1) + \\ &+ (0,09779)(0,0473) + (0,11855)(0,1) = 0,0563 \end{aligned}$$

$$H_d = 1,138 H_0$$

y aplicando esta ecuación a las dos temperaturas indicadas

$$T = 25 \text{ }^\circ\text{C} \quad H_d = 6,82 \cdot 10^5 \frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$$

$$T = 45 \text{ }^\circ\text{C} \quad H_d = 8,77 \cdot 10^5 \frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$$

En cada experimento la concentración de oxígeno de saturación se estimó tomando como presión de vapor de la disolución la correspondiente al agua pura a la misma temperatura:

$$T = 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad [\text{O}_2]^* = \frac{P_T - 23,8}{6,82 \cdot 10^5} \text{ mol/L}$$

$$T = 45 \text{ } ^\circ\text{C} \quad [\text{O}_2]^* = \frac{P_T - 71,9}{8,77 \cdot 10^5} \text{ mol/L}$$

Para las disoluciones de alanina la temperatura utilizada fue:

$$T = 39 \text{ } ^\circ\text{C} \quad H_0 = 7,24 \cdot 10^5 \frac{\text{mm Hg}}{\text{mol/L}}$$

Dado que no se dispone de datos sobre el efecto salino de la alanina se ha utilizado el parámetro de efecto salino correspondiente a la glicina ($k_i = 0,09345 \text{ L/mol}$), con lo que teniendo en cuenta las concentraciones de los distintos componentes en la disolución utilizada:

$$[\text{Alanina}] = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$[\text{Acido cítrico}] = 0,0473 \text{ mol/L}$$

$$[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 0,1084 \text{ mol/L}$$

resulta:

$$\begin{aligned} \log(H_d/H_0) &= (0,477)(\frac{1}{2} 0,1 \cdot 4) + (-0,587)(\frac{1}{2} 0,2 \cdot 1) + \\ &+ (0,09779)(0,0084) + (0,09345)(0,1) = 0,0469 \end{aligned}$$

$$H_d = 1,138 \quad H_o = 8,07 \cdot 10^5 \text{ mm Hg}/(\text{mol/L})$$

y de manera semejante a lo indicado anteriormente

$$[O_2]^* = \frac{P_T - 52,4}{8,07 \cdot 10^5} \text{ mol/L}$$

En estos experimentos, un balance del mismo en el contactor conduce a

$$N_{O_2} \cdot A = k_L \cdot A ([O_2]^* - [O_2]) = V \frac{d[O_2]}{dt} \quad [3.63]$$

siendo k_L el coeficiente de transferencia de materia, $[O_2]^*$ la concentración de oxígeno en equilibrio con la composición de la fase gaseosa, A el área interfacial, V el volumen de fase líquida, N_{O_2} el flujo de oxígeno a través de la interfase y $[O_2]$ la concentración de oxígeno en el seno de la fase líquida.

La segunda igualdad de [3.63] puede reordenarse en la forma:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]^* - [O_2]) \quad [3.64]$$

siendo a el área interfacial específica, m^{-1}

$$a = \frac{A}{V} \quad [3.65]$$

Separando variables e integrando en la ecuación [3.64]

$$\int_{[O_2]_0}^{[O_2]} \frac{d[O_2]}{[O_2]^* - [O_2]} = k_L \cdot a \int_{t_0}^t dt \quad [3.66]$$

donde el límite inferior de la integración debe corresponder a un tiempo suficiente a partir del instante en que se produce el cambio de fase gaseosa para asegurar el barrido completo del nitrógeno por el oxígeno.

Introduciendo en [3.66] la concentración de oxígeno adimensional

$$c = \frac{[O_2]}{[O_2]^*} \quad [3.67]$$

queda

$$\ln \left[\frac{1 - c_0}{1 - c} \right] = k_L \cdot a (t - t_0) \quad [3.68]$$

que puede reordenarse en la forma:

$$-\ln(1-c) = k_L \cdot a t - k_L \cdot a t_0 - \ln(1-c_0) \quad [3.69]$$

e indica que una representación de $-\ln(1-c)$ frente al tiempo para los experimentos de absorción física de oxígeno debería conducir a rectas de pendiente igual al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno correspondiente a la fase líquida, $k_L \cdot a$.

En la figura 3.5 se han representado los resultados de los experimentos con disoluciones de glucosa a 25 °C en la forma que

indica la ecuación [3.69]. Puede observarse en esta figura, que los resultados experimentales se ajustan bien a líneas paralelas como sería de esperar. En la tabla 3.14 se indican los valores de $k_L.a$ obtenidos por regresión lineal en cada experimento.

TABLA 3.14

Absorción física de oxígeno

Disoluciones de glucosa

$V = 200 \text{ cm}^3$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

<u>Exp.</u>	<u>$k_L.a, \text{ min}^{-1}$</u>	<u>r^2</u>
1	0,0324	0,996
2	0,0326	0,999
3	0,0335	0,999

que conducen a un valor medio de

$$k_L.a = 0,033 \text{ min}^{-1} \quad [3.70]$$

para la absorción de oxígeno en las condiciones indicadas, en una disolución 0,1 M de glucosa en tampón de pH = 5,55. Este resultado es del orden de magnitud generalmente encontrado en los procesos de aireación superficial.

De los resultados obtenidos a la temperatura de 45 °C, representados en la figura 3.6, se obtiene:

$$k_L.a = 0,064 \text{ min}^{-1} \quad r^2 = 0,997 \quad [3.71]$$

De acuerdo con la ecuación de Wilke y Chang para la estimación de difusividades en líquidos y utilizando la teoría de la

Figura 3.5

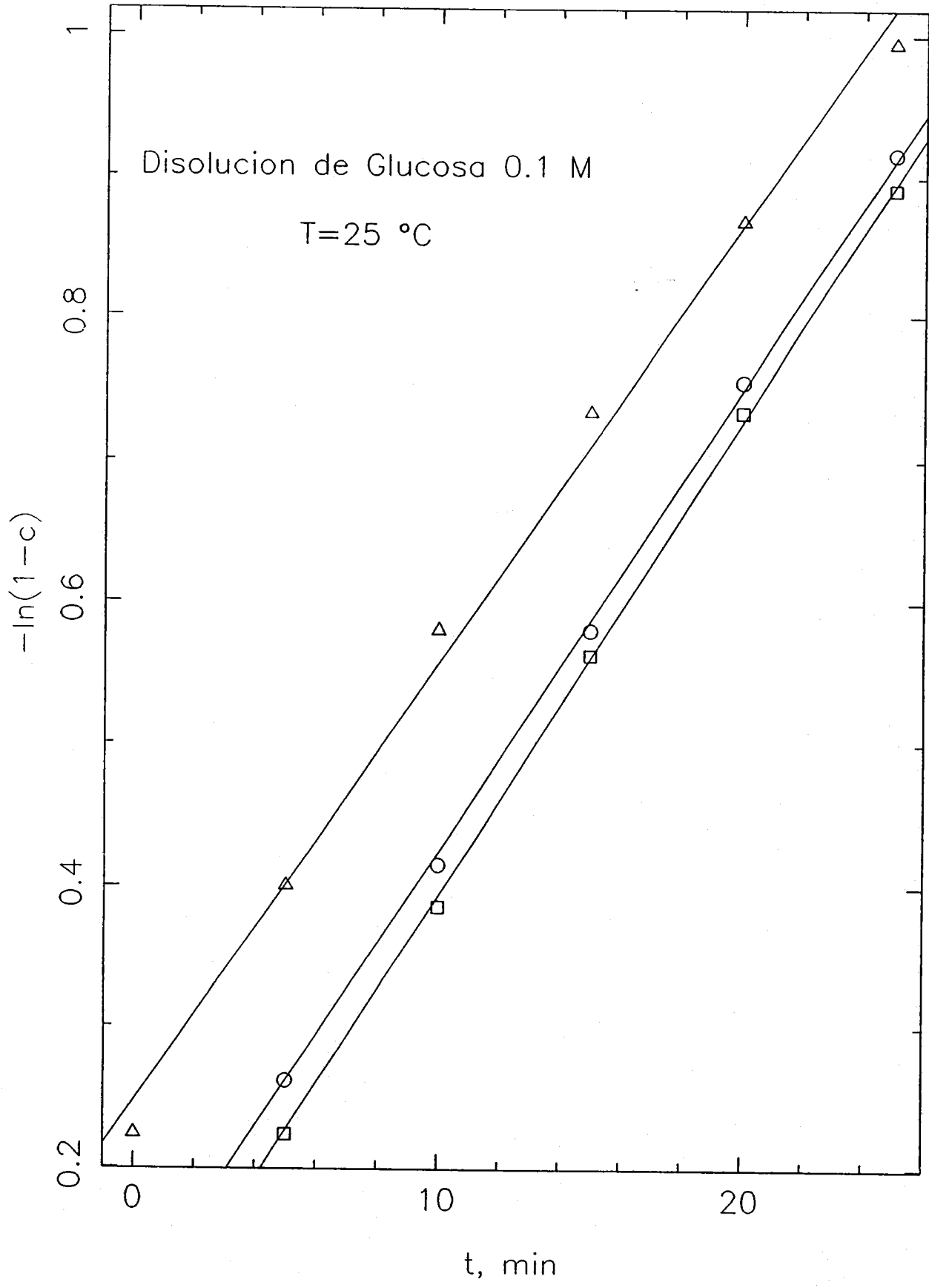
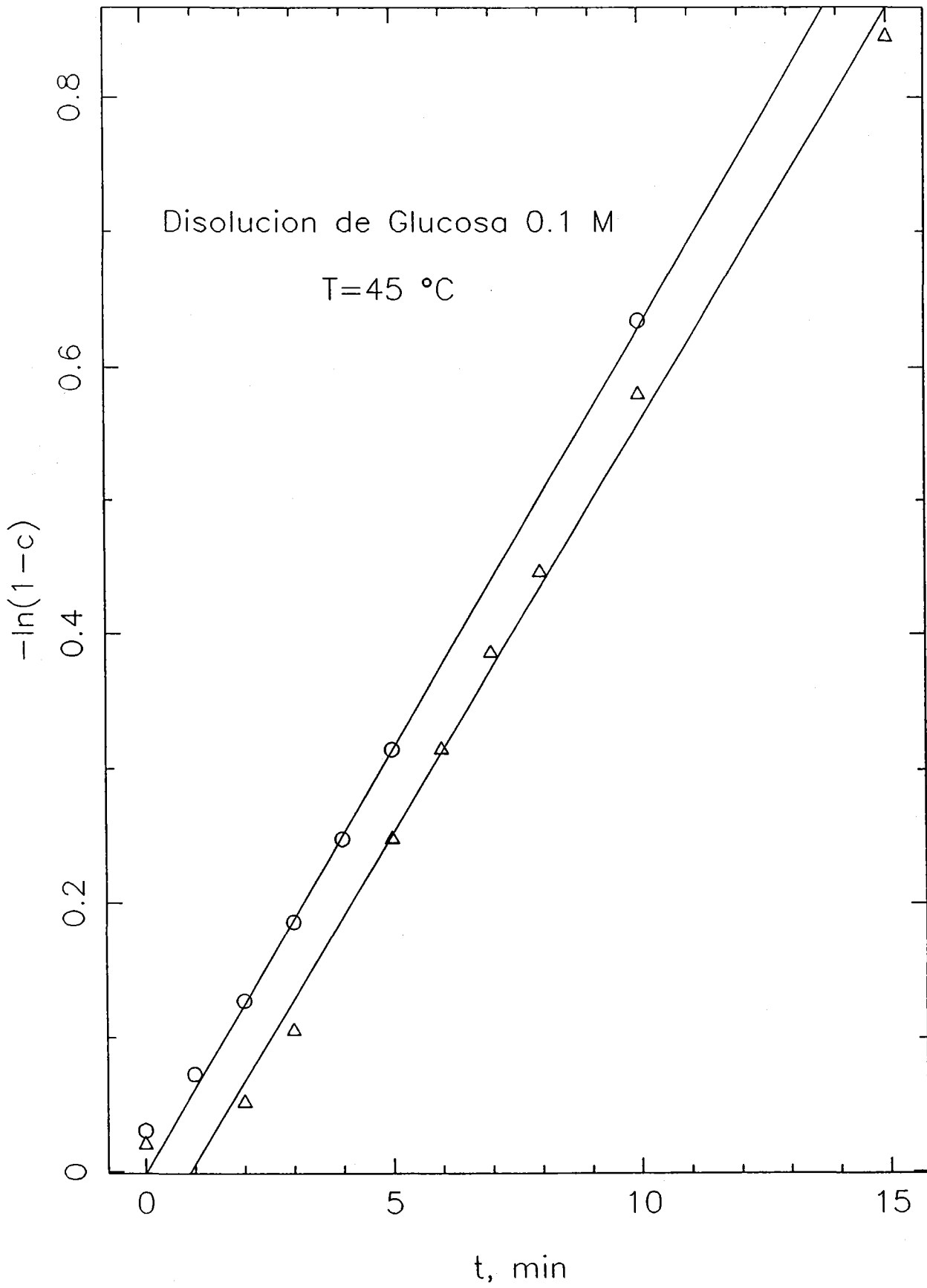


Figura 3.6



película, debe cumplirse, Aiba y col. (1984).

$$k_L \cdot a \propto (T/\mu) \quad [3.72]$$

donde μ es la viscosidad de la fase líquida a la temperatura T. Puesto que se trata de una disolución 0,1 M en glucosa, equivalente al 1,8 % en peso, su viscosidad puede expresarse como

$$\mu = 1,034 \mu_0 \quad [3.73]$$

según los datos de Ho y col. (1986), indicados en el apartado 3.3.2 de esta Memoria (tabla 3.10).

Aplicando las ecuaciones [3.72] y [3.73] a los valores de $k_L \cdot a$ obtenidos a 25 y 45 °C resulta

$$T = 25 \text{ °C} \quad k_L \cdot a = 1,02 \cdot 10^{-4} (T/\mu) \quad [3.74]$$

$$T = 45 \text{ °C} \quad k_L \cdot a = 1,14 \cdot 10^{-4} (T/\mu) \quad [3.75]$$

por lo que se ha utilizado un valor medio para la constante de $1,08 \cdot 10^{-4}$ para determinar los valores de $k_L \cdot a$ necesarios en la interpretación de los resultados de la serie E, en los que se analizó la influencia de la temperatura. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.15.

Para las disoluciones 0,1 M de alanina en tampón de pH = 7,3 solo se realizaron experimentos de absorción de oxígeno a la misma temperatura utilizada en los experimento cinéticos de 39 °C y con 100 cm³ de volumen de fase líquida lo que determinará un valor del área interfacial específica, a, prácticamente el doble que en el caso anterior.

TABLA 3.15

Coeficientes individuales de transferencia
de materia gas-líquido

<u>T, °C</u>	<u>K_L.a, min⁻¹</u>
25	0,033
30	0,042
35	0,047
40	0,052
45	0,058
50	0,065

Como se observa en la figura 3.7, los resultados obtenidos se ajustan también a la ecuaciones [3.69].

$$k_L.a = 0,128 \text{ min}^{-1} \quad r^2 = 0,997 \quad [3.76]$$

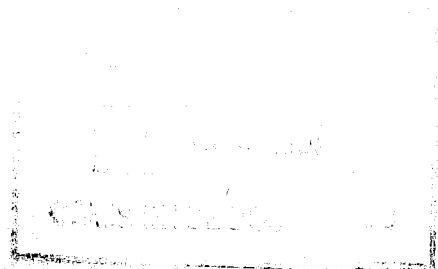
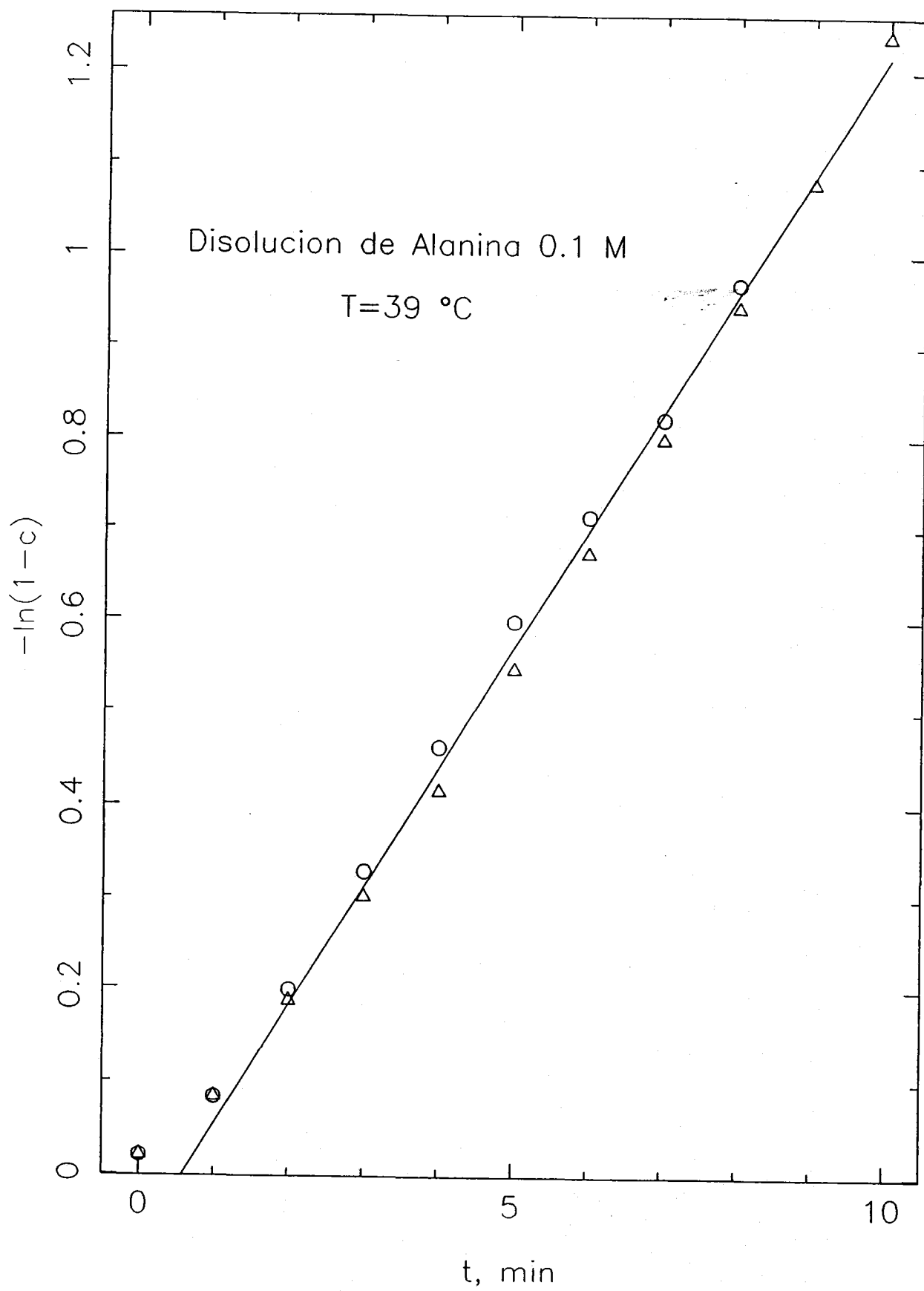
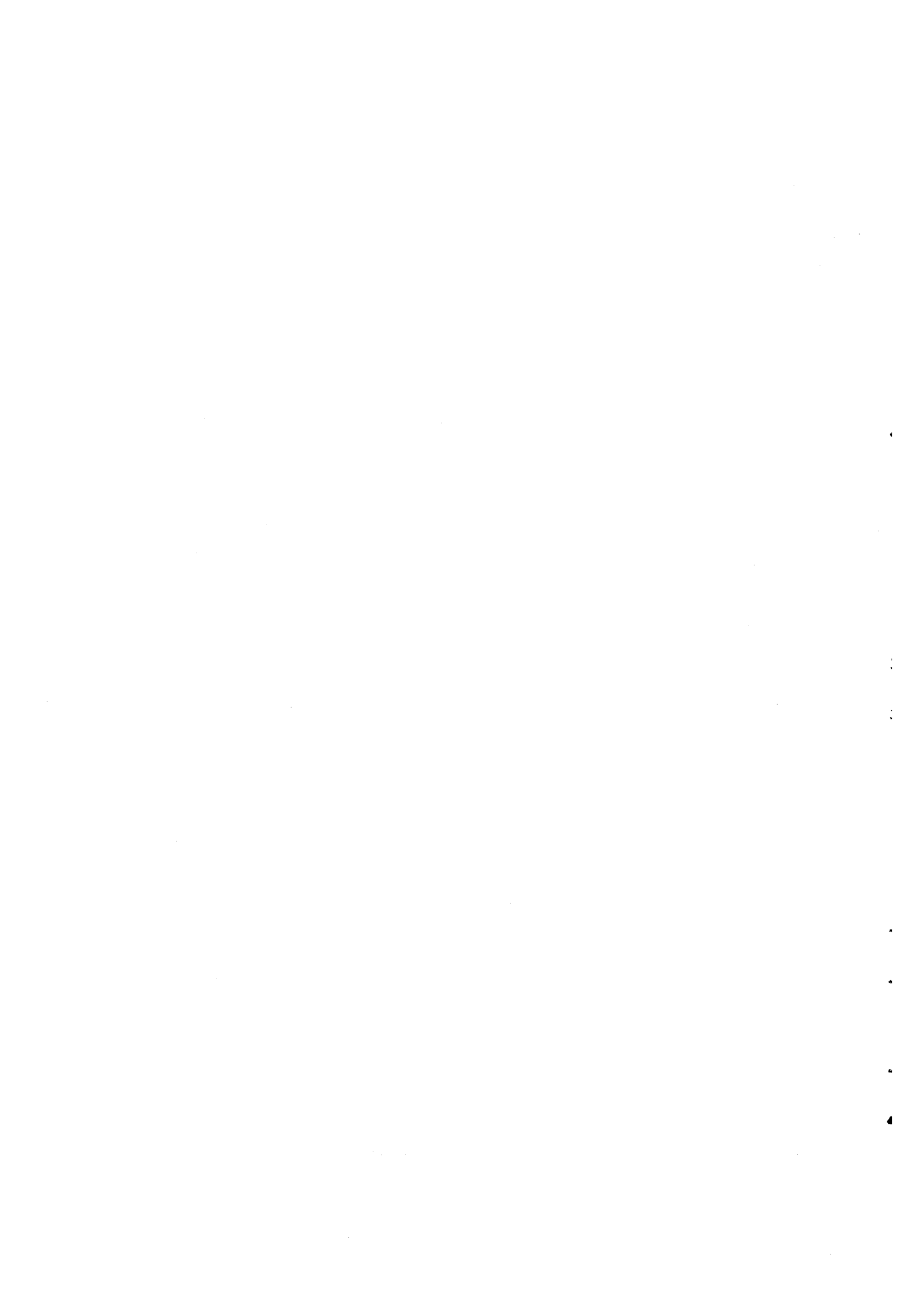


Figura 3.7



4. RESULTADOS EXPERIMENTALES



Se han estudiado experimentalmente dos sistemas enzimáticos:

- a) Oxidación de glucosa con oxígeno molecular catalizada por glucosa-oxidasa (EC 1.1.3.4.), y
- b) Oxidación de alanina con oxígeno molecular catalizada por D-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.3.).

aunque con el primero se ha llevado a cabo un estudio más completo, con vistas a su utilización como sistema modelo para el análisis de la transferencia de oxígeno en biorreactores y del segundo se analizan sólo algunas de sus características más importantes para la misma finalidad.

4.1. OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MEDIANTE GLUCOSA-OXIDASA

Utilizando el método indicado en el apartado 3 de esta Memoria se ha estudiado la cinética de la oxidación de glucosa con oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa, analizándose la influencia de las siguientes variables:

- Concentración de glucosa-oxidasa
- Concentración de catalasa
- Concentración de glucosa
- Composición de la fase gaseosa
- Temperatura
- Desnaturalización térmica

4.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA-OXIDASA

Para analizar la influencia de la concentración de glucosa-oxidasa se realizaron cinco experimentos, A.1 a A.5, a 25 °C y pH = 5,55, con oxígeno puro saturado con respecto de la fase líquida como fase gaseosa, una concentración 0,1 M de glucosa y en ausencia de catalasa. Los resultados obtenidos en estos experimentos se indican en las tablas 4.1 a 4.5 y se han representado en la figura 4.1.

En cada una de estas tablas la lectura a tiempo cero corresponde al momento en el que se empieza a contar el tiempo una vez añadida la enzima a la disolución saturada de oxígeno. La concentración de oxígeno de saturación de la interfase, $[O_2]_i$, se estimó por los métodos indicados en el apartado 3 de esta Memoria.

4.1.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE CATALASA

Con la finalidad de determinar la cantidad de catalasa necesaria para descomponer el peróxido de hidrógeno formado y evitar su acumulación para que no afecte la cinética de la oxidación de glucosa con O_2 catalizada por glucosa-oxidasa, se realizaron los experimentos B, B.1 a B.4, en igualdad de condiciones que los anteriores salvo que la concentración de glucosa-oxidasa permanecía constante e igual a 0,025 g/L y se variaba la concentración de catalasa.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se recogen en las tablas 4.6 a 4.9 y se han representado en la figura 4.2.

TABLA 4.1

Experimento A.1

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 699,6 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,91 10⁻⁴ M
[GO] = 0,05000 g/L [CT] = 0 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	81,6
5	16,3
10	6,1
15	5,1
20	5,1
25	4,5
30	4,5
35	4,5
40	4,5
45	5,1
50	5,1
55	6,1
60	6,1

TABLA 4.2

Experimento A.2

T = 25 °C pH = 5,55 P_r = 700,2 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,92 10⁻⁴ M
[GO] = 0,02500 g/L [CT] = 0 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	92,9
5	63,3
10	30,6
15	13,3
20	10,2
25	10,2
30	10,2
35	10,2
40	10,2
45	10,2
50	10,2
55	11,2
60	11,2

TABLA 4.3

Experimento A.3

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 702,4 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,95 10⁻⁴ M
[GO] = 0,01250 g/L [CT] = 0 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	91,8
5	74,5
10	59,2
15	43,9
20	33,7
25	26,5
30	22,4
35	20,4
40	20,4
45	20,4
50	20,4
55	20,4
60	20,4
70	22,4
80	23,5
90	24,5

TABLA 4.4

Experimento A.4

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 701,7 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,94 10⁻⁴ M
[GO] = 0,00625 g/L [CT] = 0 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	92,9
10	85,7
15	79,6
20	73,5
25	67,3
30	62,2
35	57,1
40	52,0
45	49,0
50	49,0
55	46,9
60	46,9
65	46,9
70	46,9

TABLA 4.5

Experimento A.5

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 702,4 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,95 10⁻⁴ M

[GO] = 0,00500 g/L [CT] = 0 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	95,9
5	88,8
10	81,6
15	75,5
20	71,4
25	67,3
30	64,3
35	61,2
40	58,2
45	56,1
50	54,1
55	52,0
60	52,0
65	52,0
70	52,0

Figura 4.1

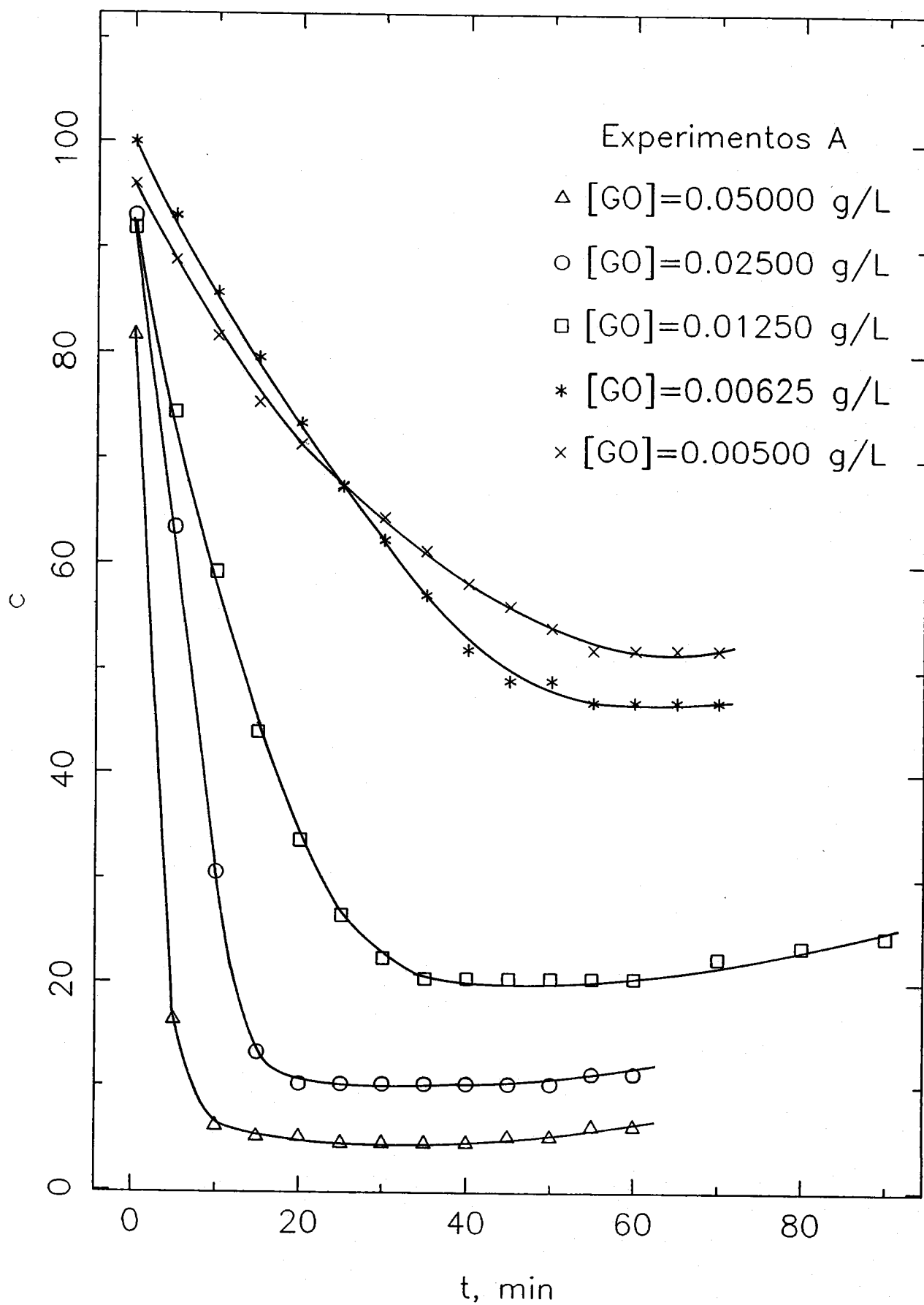


TABLA 4.6

Experimento B.1

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 700,1 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,92 10⁻⁴ M

[GO] = 0,025 g/L [CT] = 0,30000 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	90,8
5	81,6
10	67,3
15	54,1
20	43,9
25	36,7
30	30,6
35	26,5
40	24,5
45	22,4
50	21,4
55	20,4
60	20,4
70	20,4
80	20,4

TABLA 4.7

Experimento B.2

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 708,8 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,04 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,025 g/L [CT] = 0,01500 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	93,9
5	76,5
10	61,2
15	48,0
20	37,8
25	30,6
30	24,5
35	22,4
40	21,4
45	21,4
50	21,4
55	21,4
60	21,4
70	21,4
80	22,4
90	22,4

TABLA 4.8

Experimento B.3

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 707,8 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,03 10⁻⁴ M

[GO] = 0,025 g/L [CT] = 0,00750 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	94,9
5	78,6
10	63,3
15	51,0
20	40,8
25	32,7
30	28,6
35	24,5
40	22,4
45	21,4
50	21,4
55	21,4
60	21,4
65	21,4
70	21,4
80	21,4
90	21,4
100	21,4

TABLA 4.9

Experimento B.4

T = 25 °C

pH = 5,55

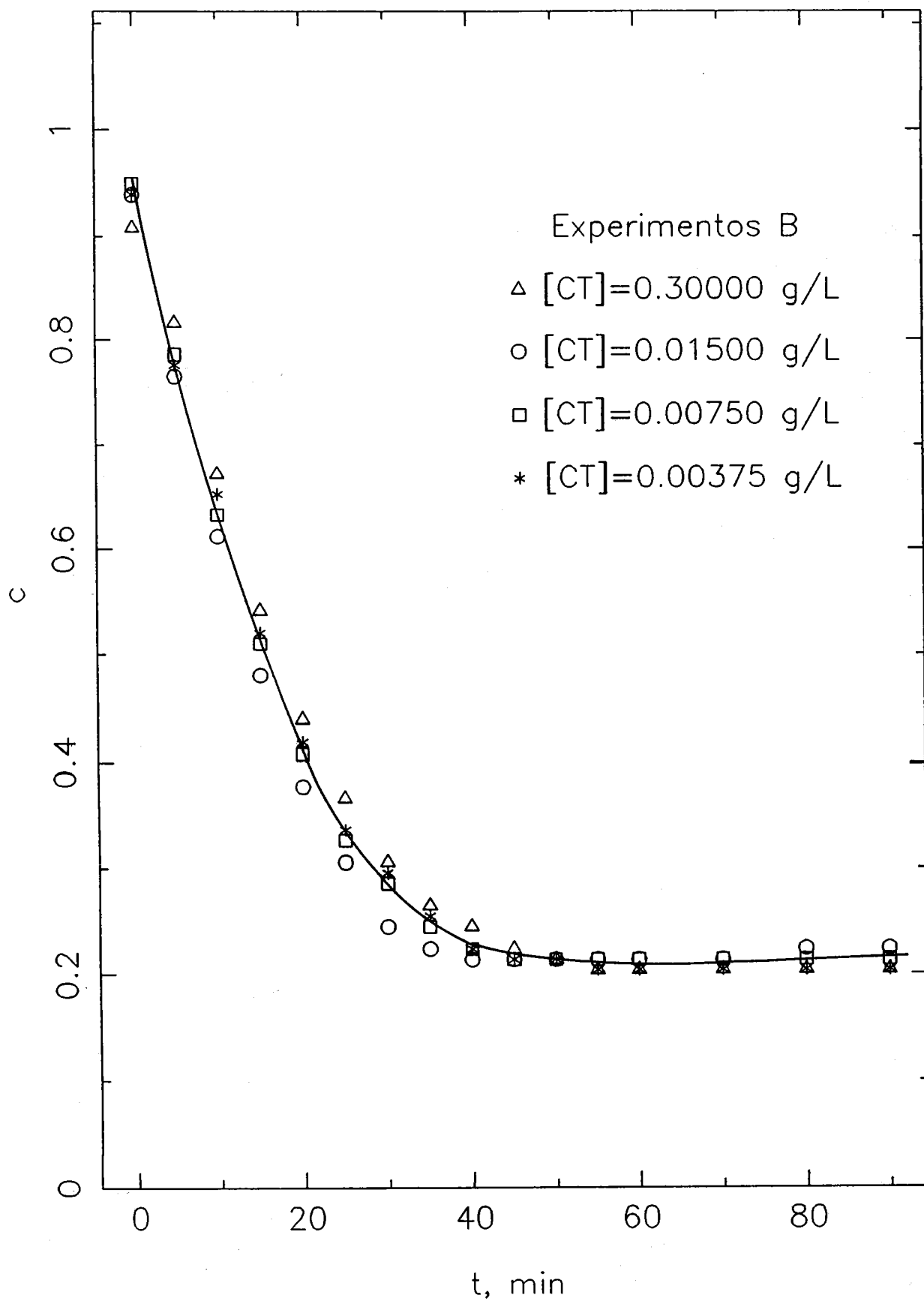
P_T = 707,8 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,03 10⁻⁴ M

[GO] = 0,025 g/L [CT] = 0,00375 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	93,9
5	77,6
10	65,3
15	52,0
20	41,8
25	33,7
30	29,6
35	25,5
40	22,4
45	21,4
50	21,4
55	20,4
60	20,4
70	20,4
80	20,4
90	20,4
100	20,4

Figura 4.2



4.1.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA

Para analizar la influencia de la concentración de glucosa se realizaron los experimentos C.1 a C.8, todos ellos con una concentración de glucosa-oxidasa de 0,05 g/L y una concentración de catalasa igual a 0,0075 g/L y en las mismas condiciones anteriores, variando la concentración de glucosa desde 0,2 a 0,005 M.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se reflejan en las tablas 4.10 a 4.17 y quedan representados en las figuras 4.3, 4.4 y 4.5.

4.1.4. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE LA FASE GASEOSA

Para analizar la influencia de la composición de la fase gaseosa se realizaron 9 experimentos, experimentos D.1 a D.9, en las mismas condiciones de temperatura, pH, con disoluciones 0,1 M en glucosa y en presencia de catalasa, 0,0075 g/L. En los experimentos D.1 a D.4 se utilizó como fase gaseosa mezclas oxígeno-nitrógeno con 20, 40, 60 y 80 % de O₂, respectivamente y una concentración de glucosa-oxidasa de 0,05 g/L. Los resultados correspondientes a estos experimentos se indican en las tablas 4.18 a 4.21 y se han representado en la figura 4.6, en la que se observa que las concentraciones de estado estacionario alcanzadas son muy bajas, todas inferiores al 10 % de [O₂]_i, lo que indica gran influencia de la transferencia de materia.

Por esta razón los restantes experimentos de esta serie fueron realizados con una concentración menor de glucosa-oxidasa, 0,0125 g/L, y para composiciones de la fase gaseosa de 20, 40, 60, 80 y 100 % de oxígeno respectivamente. Las tablas 4.22 a 4.26

TABLA 4.10

Experimento C.1

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 696,8 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,60 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,200 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	86,7
5	56,1
10	25,5
15	16,3
20	11,2
25	10,2
30	10,2
35	10,2
40	9,2
45	9,2
50	9,2
55	9,2
60	9,2
70	9,2
80	9,2

TABLA 4.11

Experimento C.2

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 696,8 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,85 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,100 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	86,7
5	64,3
10	33,7
15	18,4
20	13,3
25	11,2
30	10,2
35	10,2
40	10,2
45	10,2
50	10,2
55	10,2
60	10,2
70	10,2
80	10,2

TABLA 4.12

Experimento C.3

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 698,2 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,02 10⁻⁴ M

[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,050 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	90,8
5	68,4
10	43,9
15	28,6
20	19,4
25	14,3
30	12,2
35	12,2
40	12,2
45	12,2
50	12,2
55	12,2
60	12,2
65	12,2
70	12,2
80	12,2
90	12,2
100	12,2
110	12,2
120	12,2
140	12,2

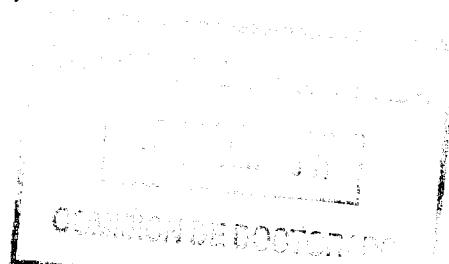


TABLA 4.13

Experimento C.4

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 697,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,04 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,035 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	91,8
5	74,5
10	58,2
15	42,9
20	31,6
25	23,5
30	19,4
35	16,3
40	14,3
45	14,3
50	14,3
55	14,3
60	14,3
70	14,3
80	14,3
90	14,3
100	14,3
110	14,3
120	14,3

TABLA 4.14

Experimento C.5

T = 25 °C

pH = 5,55

P_r = 698,2 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,10 · 10⁻⁴ M

[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,020 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	90,8
5	77,6
10	68,4
15	59,2
20	50,0
25	43,9
30	37,8
35	34,7
40	31,6
45	29,6
50	28,6
55	28,6
60	28,6
70	28,6
80	28,6
90	28,6
100	30,6
110	31,6
120	32,7

TABLA 4.15

Experimento C.6

T = 25 °C pH = 5,55 P_r = 697,3 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,10 · 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,015 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	94,9
5	87,8
10	81,6
15	75,5
20	70,4
25	65,3
30	60,2
35	55,1
40	52,0
45	49,0
50	46,9
55	45,9
60	44,9
65	44,9
70	43,9
80	43,9
90	44,9
100	45,9
110	46,9
120	49,0
150	55,1
200	62,2
250	69,4

TABLA 4.16

Experimento C.7

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 695,7 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,09 10⁻⁴ M

[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,010 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	96,9
5	89,8
10	84,7
15	79,6
20	75,5
25	71,4
30	68,4
35	65,3
40	63,3
45	61,2
50	60,2
55	59,2
60	59,2
70	59,2
80	59,2
90	60,2
100	61,2
110	62,2
120	63,3

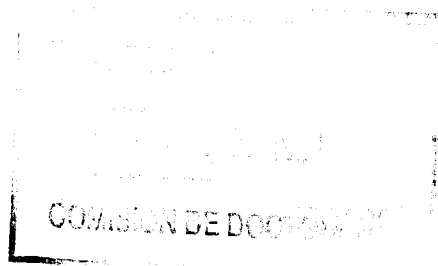


TABLA 4.17

Experimento C.8

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 707,9 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 10,29 · 10⁻⁴ M

[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,005 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	98,0
10	94,9
15	91,8
20	90,8
25	89,8
30	89,8
35	88,8
40	88,8
45	87,8
50	87,8
55	87,8
60	87,8
115	87,8
120	88,8
135	88,8
140	89,8
205	90,8
375	93,9
480	94,9
520	94,9
...
1370	100,0

Figura 4.3

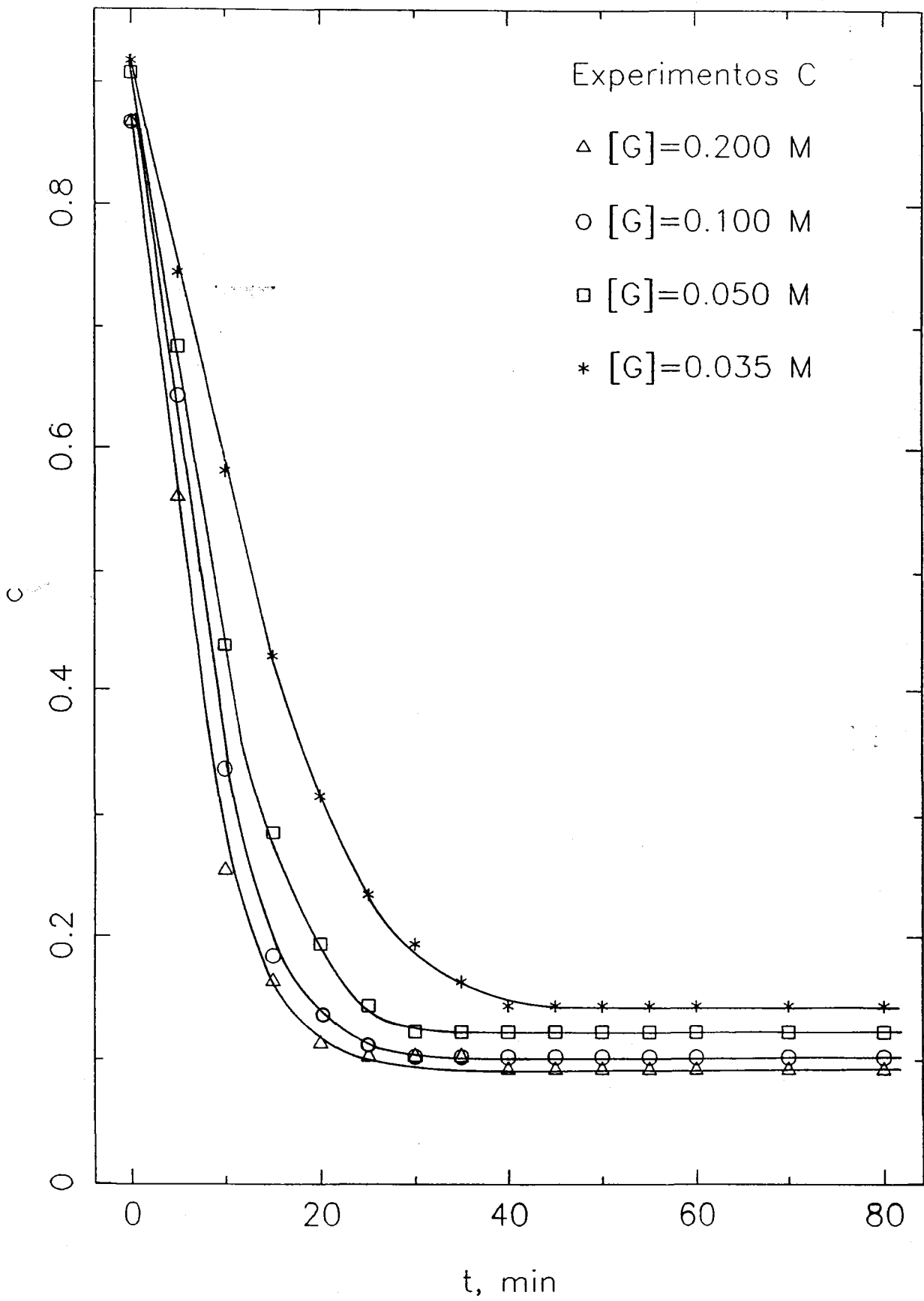


Figura 4.4

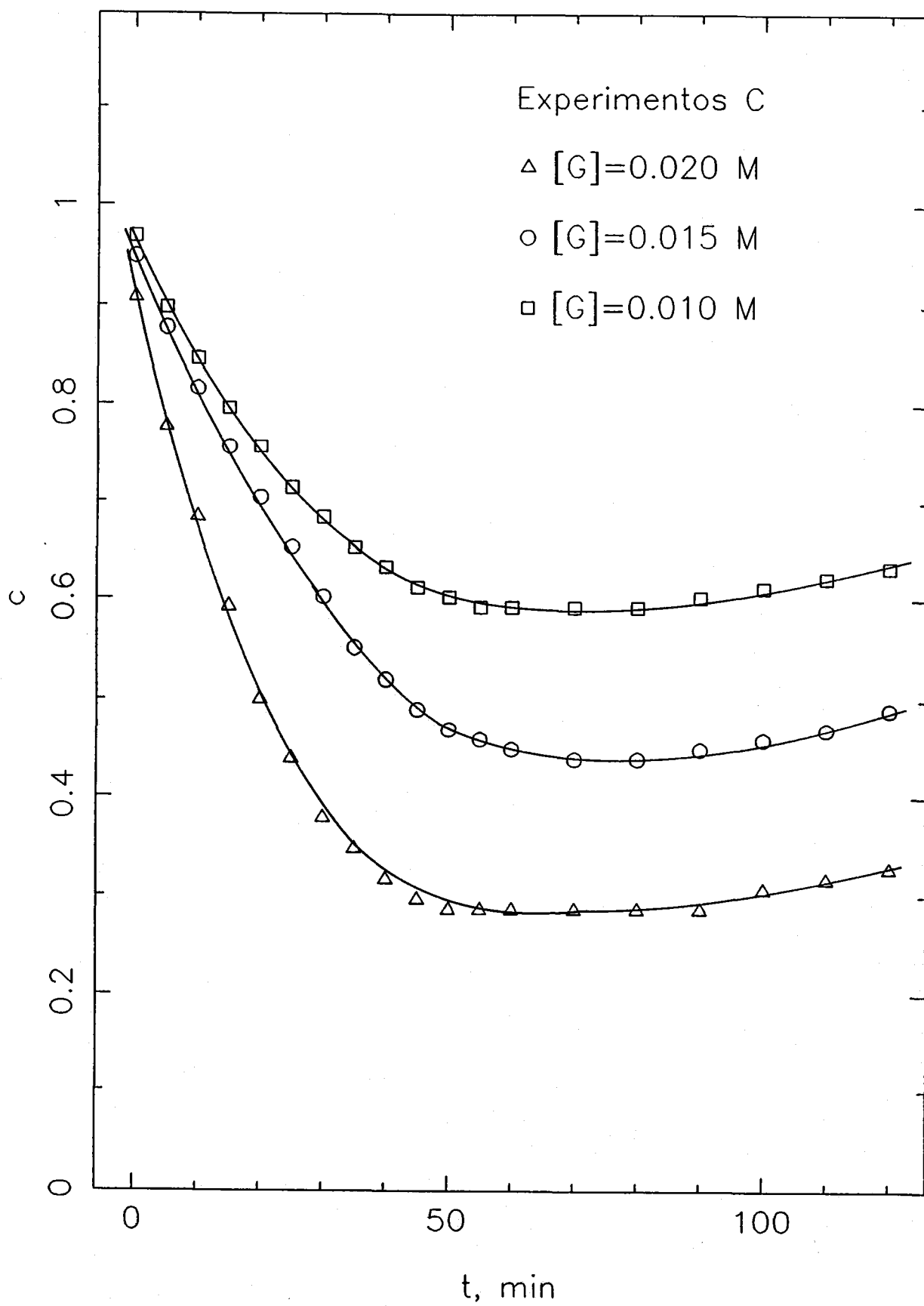


Figura 4.5

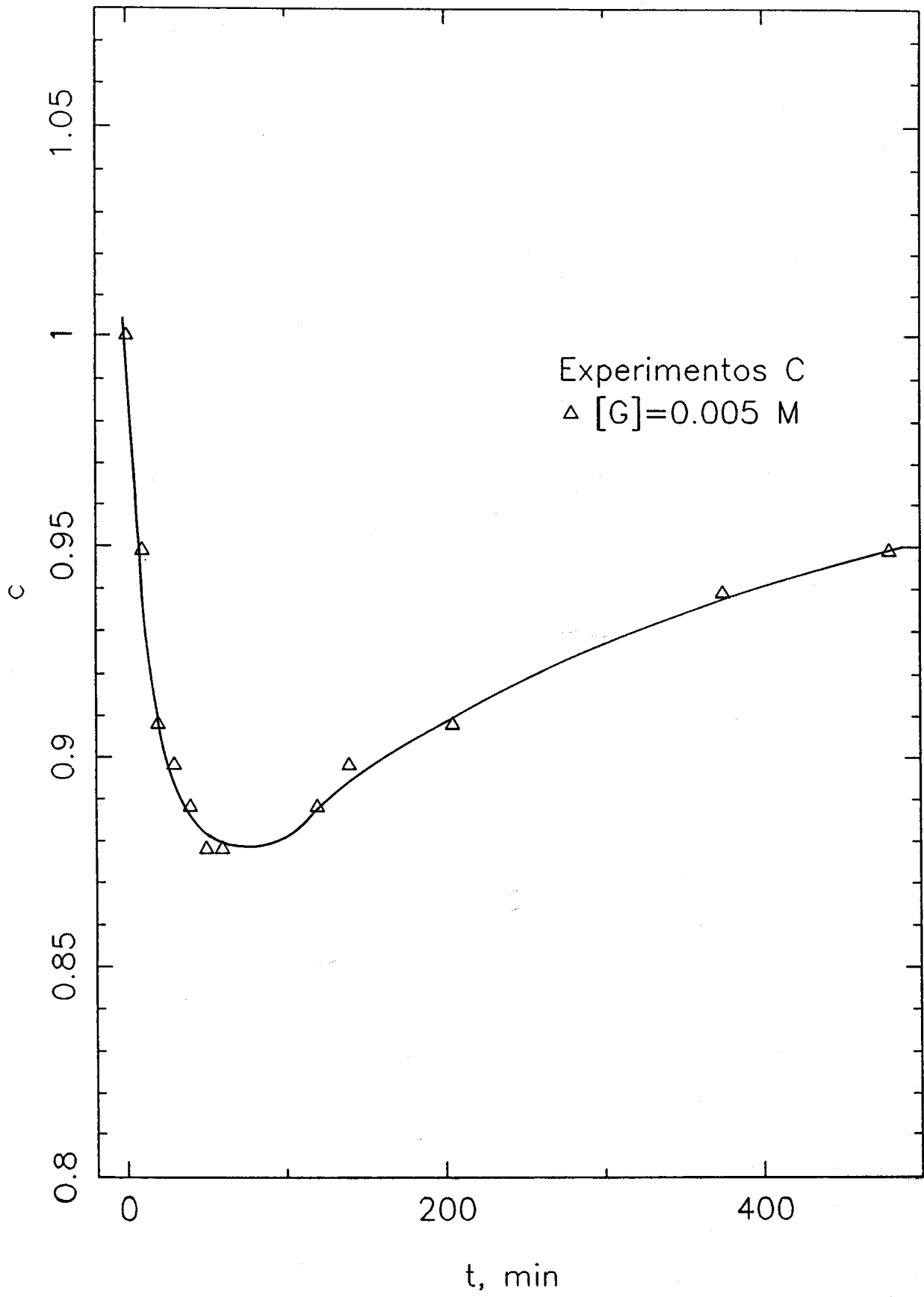


TABLA 4.18

Experimento D.1

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 705,4 mm Hg
Fase gaseosa: 20 % de O₂ [O₂]_i = 2,00 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	84,7
5	51,0
10	20,4
15	8,2
20	4,1
25	4,1
30	3,1
35	3,1
40	2,1
45	2,1
50	2,1
55	2,1
60	2,1
70	2,1
80	2,1

TABLA 4.19

Experimento D.2

T = 25 °C

pH = 5,55

P_T = 701,4 mm Hg

Fase gaseosa: 40 % de O₂

[O₂]_i = 3,97 10⁻⁴ M

[GO] = 0,050 g/L

[CT] = 0,0075 g/L

[G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	88,8
5	51,0
10	23,5
15	11,2
20	7,1
25	5,1
30	4,0
35	4,0
40	4,0
45	4,0
50	4,0
55	4,0
60	4,0
70	4,0
80	4,0

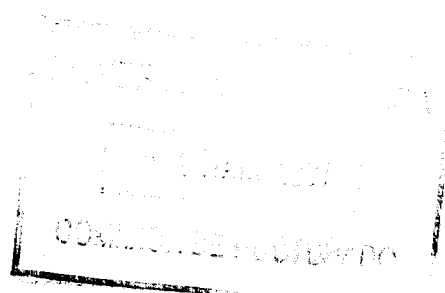


TABLA 4.20

Experimento D.3

T = 25 °C pH = 5,55 P_r = 707,2 mm Hg
Fase gaseosa: 60 % de O₂ [O₂]_i = 6,00 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	85,7
5	52,0
10	22,4
15	10,2
20	7,1
25	6,1
30	6,1
35	6,1
40	6,1
45	6,1
50	6,1
55	6,1
60	6,1
70	6,1
80	6,1

TABLA 4.21

Experimento D.4

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 704,6 mm Hg
Fase gaseosa: 80 % de O₂ [O₂]_i = 7,97 10⁻⁴ M
[GO] = 0,050 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	84,7
5	55,1
10	28,6
15	15,3
20	10,2
25	9,2
30	8,2
35	8,2
40	8,2
45	8,2
50	8,2
55	8,2
60	8,2
70	8,2
80	8,2

Figura 4.6

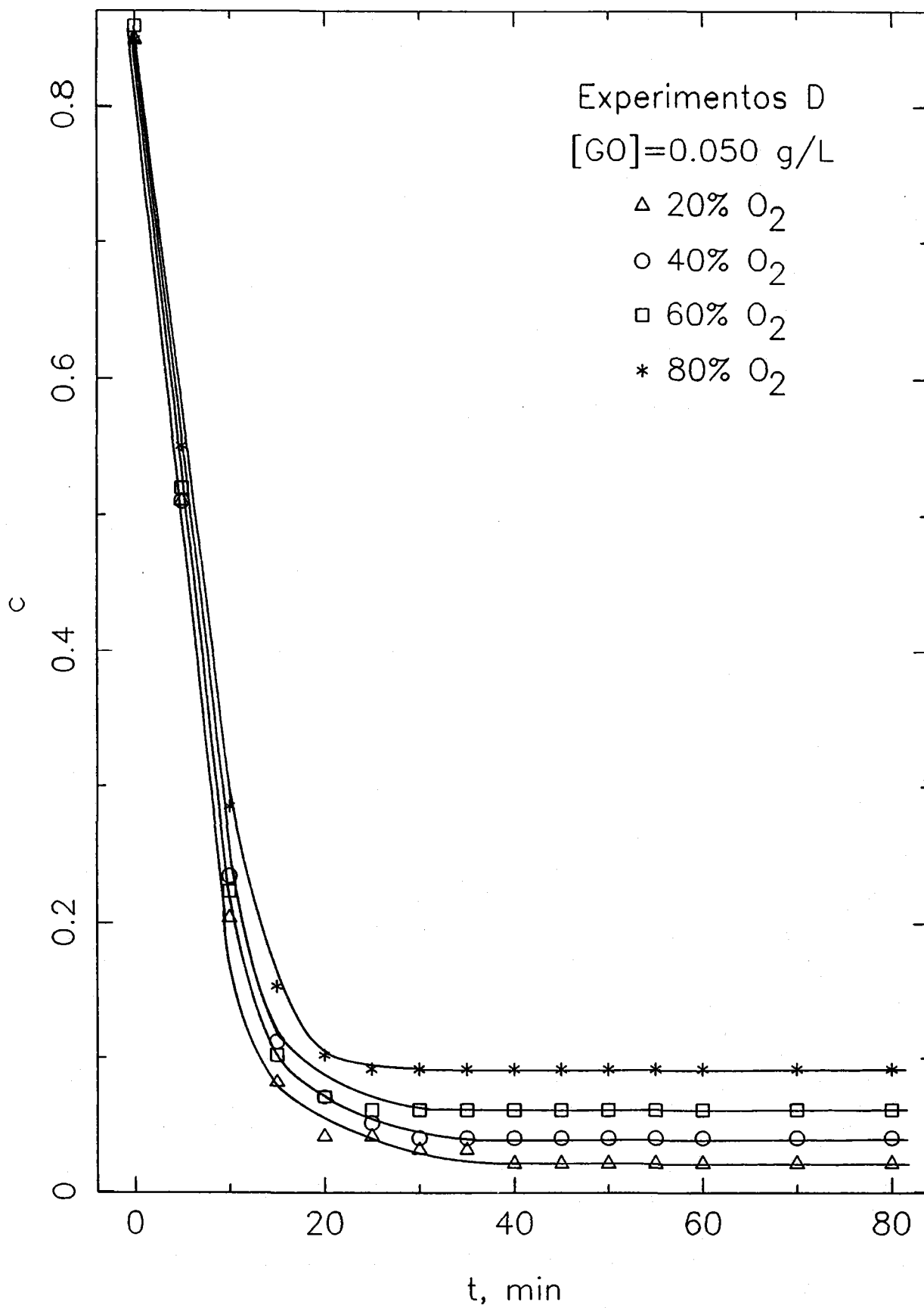


TABLA 4.22

Experimento D.5

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 702,7 mm Hg
Fase gaseosa: 20 % de O₂ [O₂]_i = 2,03 10⁻⁴ M
[GO] = 0,015 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	88,8
5	73,5
10	59,2
15	45,9
20	32,7
25	24,5
30	18,4
35	15,3
40	13,3
45	12,2
50	11,2
55	10,2
60	10,2
70	10,2
80	10,2

TABLA 4.23

Experimento D.6

T = 25 °C pH = 5,55 P_r = 700,2 mm Hg
Fase gaseosa: 40 % de O₂ [O₂]_i = 3,96 10⁻⁴ M
[GO] = 0,015 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	88,8
5	77,6
10	63,3
15	49,0
20	38,8
25	30,6
30	24,5
35	20,4
40	17,3
45	16,3
50	15,3
55	15,0
60	15,0
70	15,0
80	15,0

TABLA 4.24

Experimento D.7

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 707,2 mm Hg
Fase gaseosa: 60 % de O₂ [O₂]_i = 5,94 10⁻⁴ M
[GO] = 0,015 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	89,8
5	79,6
10	70,4
15	61,2
20	53,1
25	44,9
30	38,8
35	34,7
40	30,6
45	28,6
50	26,5
55	24,5
60	22,4
70	22,4
80	22,4



TABLA 4.25

Experimento D.8

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 707,3 mm Hg
Fase gaseosa: 80 % de O₂ [O₂]_i = 8,01 10⁻⁴ M
[GO] = 0,015 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	91,0
5	82,0
10	74,0
15	65,0
20	57,0
25	50,0
30	44,0
35	40,0
40	36,0
45	34,0
50	32,0
55	30,0
60	30,0
70	30,0
80	30,0

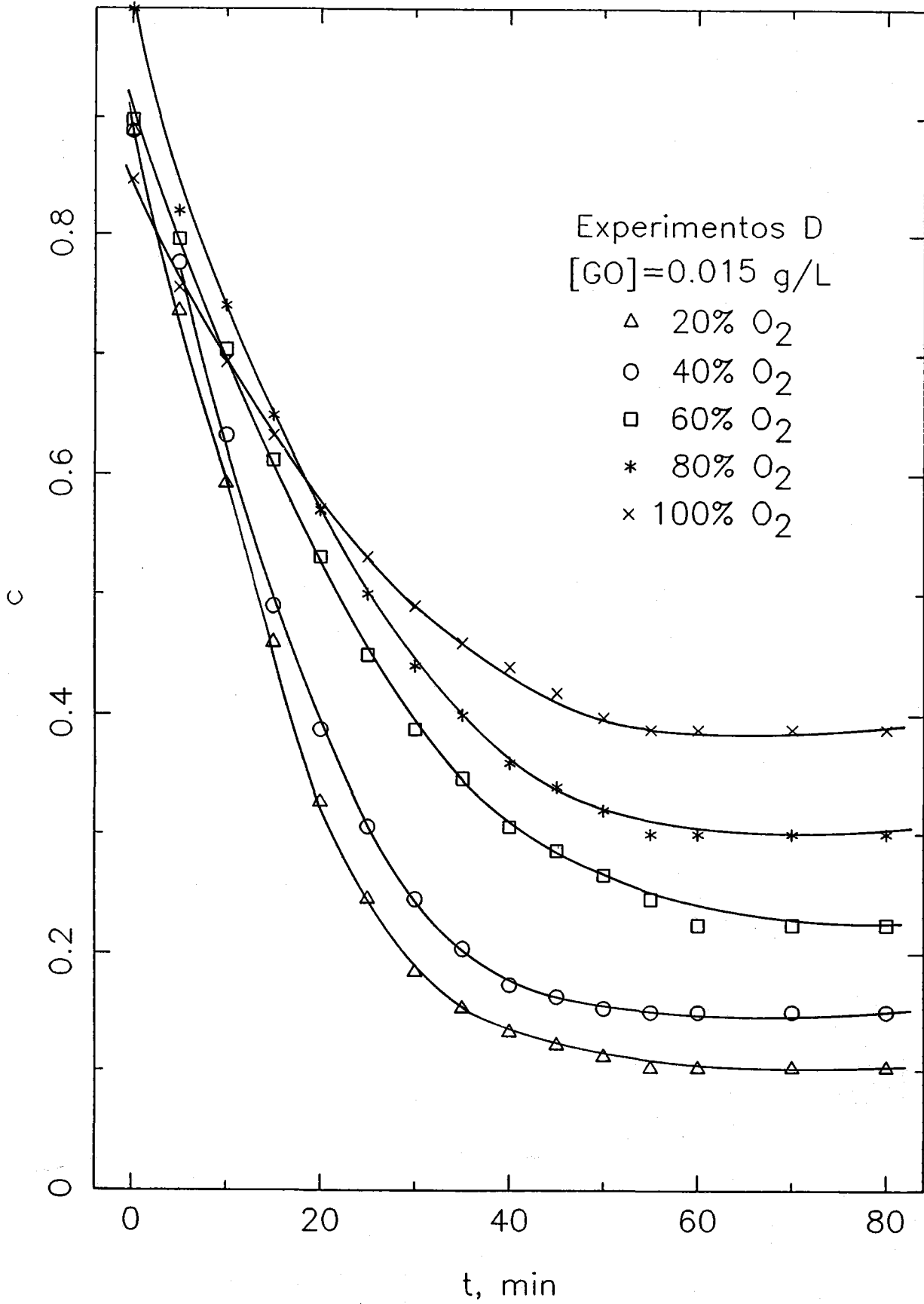
TABLA 4.26

Experimento D.9

T = 25 °C pH = 5,55 P_T = 707,3 mm Hg
Fase gaseosa: 100 % de O₂ [O₂]_i = 10,01 10⁻⁴ M
[GO] = 0,015 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	84,7
5	75,5
10	69,4
15	63,3
20	57,1
25	53,1
30	49,0
35	45,9
40	43,9
45	41,8
50	39,8
55	38,8
60	38,8
70	38,8
80	38,8

Figura 4.7



contienen los resultados obtenidos en estos experimentos, quedando representados en la figura 4.7.

4.1.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Con objeto de estudiar experimentalmente la influencia de la temperatura se realizaron cinco series de experimentos a las temperaturas de 30, 35, 40, 45 y 50 °C, respectivamente, ya que de acuerdo con el estudio bibliográfico, por encima de 50 °C la desnaturalización térmica de la enzima puede empezar a influir en los resultados obtenidos.

Todas las series fueron realizadas a pH = 5,55 y con oxígeno puro saturado con respecto a la fase líquida como fase gaseosa. En cada serie se utilizaron tres concentraciones de glucosa-oxidasa: 0,05, 0,025 y 0,0125 g/L en presencia de catalasa, 0,075 g/L y un experimento más con 0,025 g/L de glucosa-oxidasa sin catalasa y en presencia de una concentración 1 mM de KCN, con objeto de evitar la acción de las pequeñas trazas de catalasa que pudiera llevar la glucosa-oxidasa. Este último experimento comparado con el correspondiente a la concentración doble de glucosa-oxidasa en presencia de catalasa, permitiría comprobar si a la temperatura considerada la concentración de catalasa utilizada era suficiente o esta última experimentaba alguna desnaturalización térmica.

Los resultados obtenidos en estas cinco series, experimentos E, se indican en las tablas 4.27 a 4.46 y se han representado en las figuras 4.8 a 4.12.

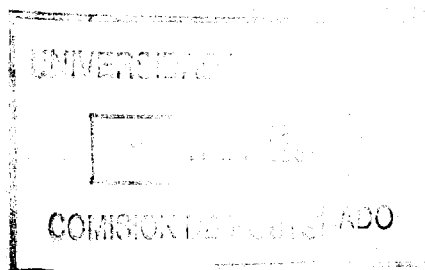


TABLA 4.27

Experimento E.1

T = 30 °C

pH = 5,55

P_T = 705,9 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,11 · 10⁻⁴ M

[GO] = 0,0500 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	65,3
10	36,7
15	24,5
20	18,4
25	16,3
30	15,3
35	14,3
40	14,3
45	13,3
50	13,3
55	13,3
60	13,3
70	13,3
80	13,3
90	14,3
100	15,3
160	15,3

TABLA 4.28

Experimento E.2

T = 30 °C pH = 5,55 P_r = 705,9 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,11 · 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M
 [KCN] = 1 mM

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	98,0
5	75,0
10	50,0
15	34,0
20	16,0
25	13,0
30	12,0
35	12,0
40	12,0
45	12,0
50	12,0
55	12,0
60	12,0
70	12,0
80	13,0
90	15,0
100	16,0
110	17,0
120	18,0
125	19,0

TABLA 4.29

Experimento E.3

T = 30 °C pH = 5,55 P_T = 705,9 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,11 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	85,7
5	69,4
10	56,1
15	40,8
20	32,7
25	30,6
30	28,6
35	27,6
40	26,5
45	26,5
50	26,5
55	26,5
60	26,5
70	26,5
80	26,5
90	27,6
100	28,6
120	29,6
125	31,6

TABLA 4.30

Experimento E.4

T = 30 °C pH = 5,55 Pr = 705,9 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 9,11 · 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,0125 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	89,8
10	85,7
15	81,6
20	77,6
25	73,5
30	69,4
35	65,3
40	62,2
45	60,2
50	58,2
55	58,2
60	58,2
70	58,2
80	58,2
90	58,2
100	58,2
110	59,2
120	59,2
130	60,2
140	61,2

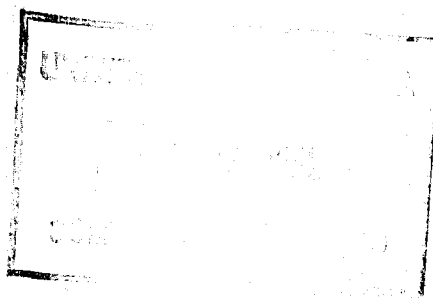


TABLA 4.31

Experimento E.5

T = 35 °C pH = 5,55 P_T = 702,1 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,35 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0500 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	95,9
5	46,9
10	24,5
15	18,4
20	16,3
25	16,3
30	16,3
35	16,3
40	16,3
45	16,3
50	16,3
55	16,3
60	16,3
70	16,3

TABLA 4.32

Experimento E.6

T = 35 °C pH = 5,55 P_T = 702,1 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,35 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M
 [KCN] = 1 mM

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	53,0
10	24,0
15	18,0
20	16,0
25	16,0
30	16,0
35	16,0
40	16,0
45	16,0
50	16,0
55	16,0
60	16,0
70	16,0

TABLA 4.33

Experimento E.7

T = 35 °C pH = 5,55 P_T = 702,1 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,35 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	89,8
10	77,6
15	63,3
20	52,0
25	45,9
30	41,8
35	38,8
40	36,7
45	35,7
50	35,7
55	35,7
60	35,7
85	36,7

TABLA 4.34

Experimento E.8

T = 35 °C pH = 5,55 P_T = 702,1 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,35 · 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,0125 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	100,0
10	100,0
15	90,8
20	85,7
25	81,6
30	77,6
35	75,5
40	73,5
45	71,4
50	69,4
55	69,4
60	69,4

TABLA 4.35

Experimento E.9

T = 40 °C

pH = 5,55

P_T = 702,3 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,77 10⁻⁴ M

[GO] = 0,0500 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	61,2
10	33,7
15	25,5
20	23,5
25	22,4
30	21,4
35	20,4
40	20,4
45	20,4
50	20,4
55	20,4
60	20,4

TABLA 4.36

Experimento E.10

T = 40 °C pH = 5,55 P_T = 702,3 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,77 · 10⁻⁴ M

[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

[KCN] = 1 mM

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	61,2
10	31,6
15	23,5
20	21,4
25	20,4
30	20,4
35	20,4
40	20,4
45	22,4
50	23,5
55	24,5
60	26,5
70	30,6
80	34,7
90	38,8
120	57,1

TABLA 4.37

Experimento E.11

T = 40 °C pH = 5,55 P_T = 702,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,77 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	99,0
10	80,6
15	65,3
20	55,1
25	49,0
30	45,9
35	43,9
40	42,9
45	41,8
50	40,8
55	40,8
60	40,8

TABLA 4.38

Experimento E.12

T = 40 °C pH = 5,55 P_T = 702,3 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,77 · 10⁻⁴ M

[GO] = 0,0125 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	100,0
10	99,0
15	98,0
20	92,9
25	87,8
30	83,7
35	81,6
40	80,6
45	80,6
50	80,6
55	80,6
60	80,6

TABLA 4.39

Experimento E.13

T = 45 °C pH = 5,55 P_T = 704,6 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,21 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0500 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	64,3
10	29,6
15	29,6
20	26,5
25	25,5
30	25,5
35	25,5
40	25,5
45	25,5
50	25,5
55	26,5
60	26,5

TABLA 4.40

Experimento E.14

T = 45 °C pH = 5,55 P_T = 704,6 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,21 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M
[KCN] = 1 mM

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	52,0
10	31,6
15	28,6
20	27,6
25	26,5
30	26,5
35	26,5
40	29,6
45	31,6
50	33,7
55	35,7
60	37,8

TABLA 4.41

Experimento E.15

T = 45 °C pH = 5,55 Pr = 704,6 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,21 · 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	95,9
10	77,6
15	66,3
20	60,2
25	57,1
30	55,1
35	53,1
40	51,0
45	51,0
50	51,0
55	51,0
60	51,0

TABLA 4.42

Experimento E.16

T = 45 °C pH = 5,55 P_r = 704,6 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 7,21 10⁻⁴ M
 [GO] = 0,0125 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	100,0
10	99,0
15	92,9
20	87,8
25	82,7
30	80,6
35	79,6
40	78,6
45	78,6
50	78,6
55	79,6
60	81,6

TABLA 4.43

Experimento E.17

T = 50 °C pH = 5,55 P_T = 705,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 6,69 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0500 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	66,3
10	43,9
15	36,7
20	34,7
25	33,6
30	33,6
35	33,6
40	33,6
45	33,6
50	33,6
55	34,7
60	34,7

TABLA 4.44

Experimento E.18

T = 50 °C pH = 5,55 P_r = 705,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 6,69 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M
[KCN] = 1 mM

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	53,1
10	36,7
15	33,7
20	32,7
25	32,7
30	32,7
35	32,7
40	33,7
45	36,7
50	40,8
55	42,9
60	44,9
65	48,0
70	50,0
75	52,0
80	54,1

LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF CALIFORNIA

TABLA 4.45

Experimento E.19

T = 50 °C pH = 5,55 P_r = 705,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 6,69 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0250 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	77,6
10	63,3
15	56,1
20	57,1
25	60,2
30	59,2
35	59,2
40	59,2
45	59,2
50	59,2
55	59,2
60	60,2

TABLA 4.46

Experimento E.20

T = 50 °C pH = 5,55 Pr = 705,3 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 6,69 10⁻⁴ M
[GO] = 0,0125 g/L [CT] = 0,0075 g/L [G] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	100,0
10	98,0
15	89,8
20	80,6
25	78,6
30	78,6
35	78,6
40	78,6
45	78,6
50	78,6
55	80,6
60	79,6
65	84,7
70	83,7

Figura 4.8

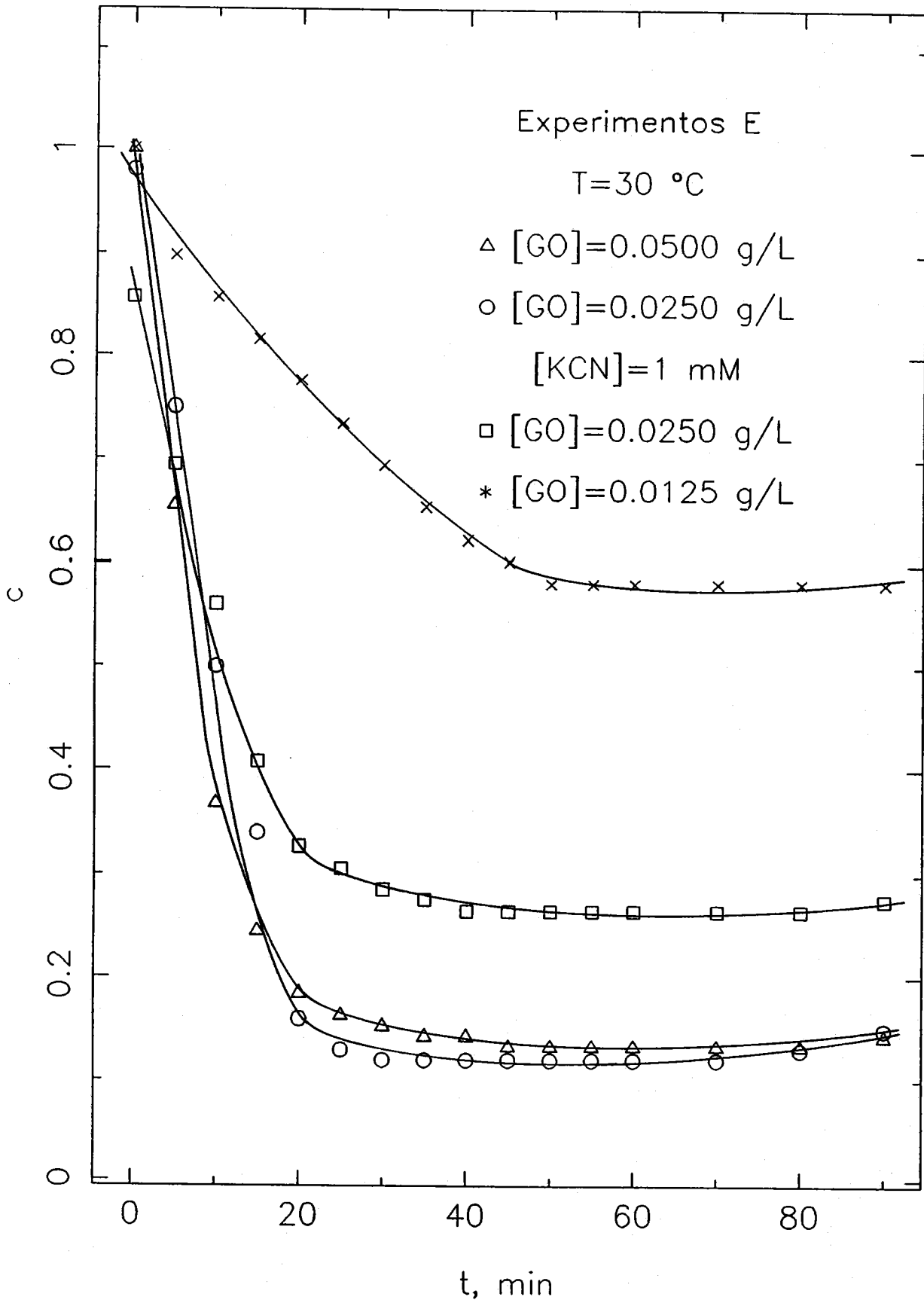


Figura 4.9

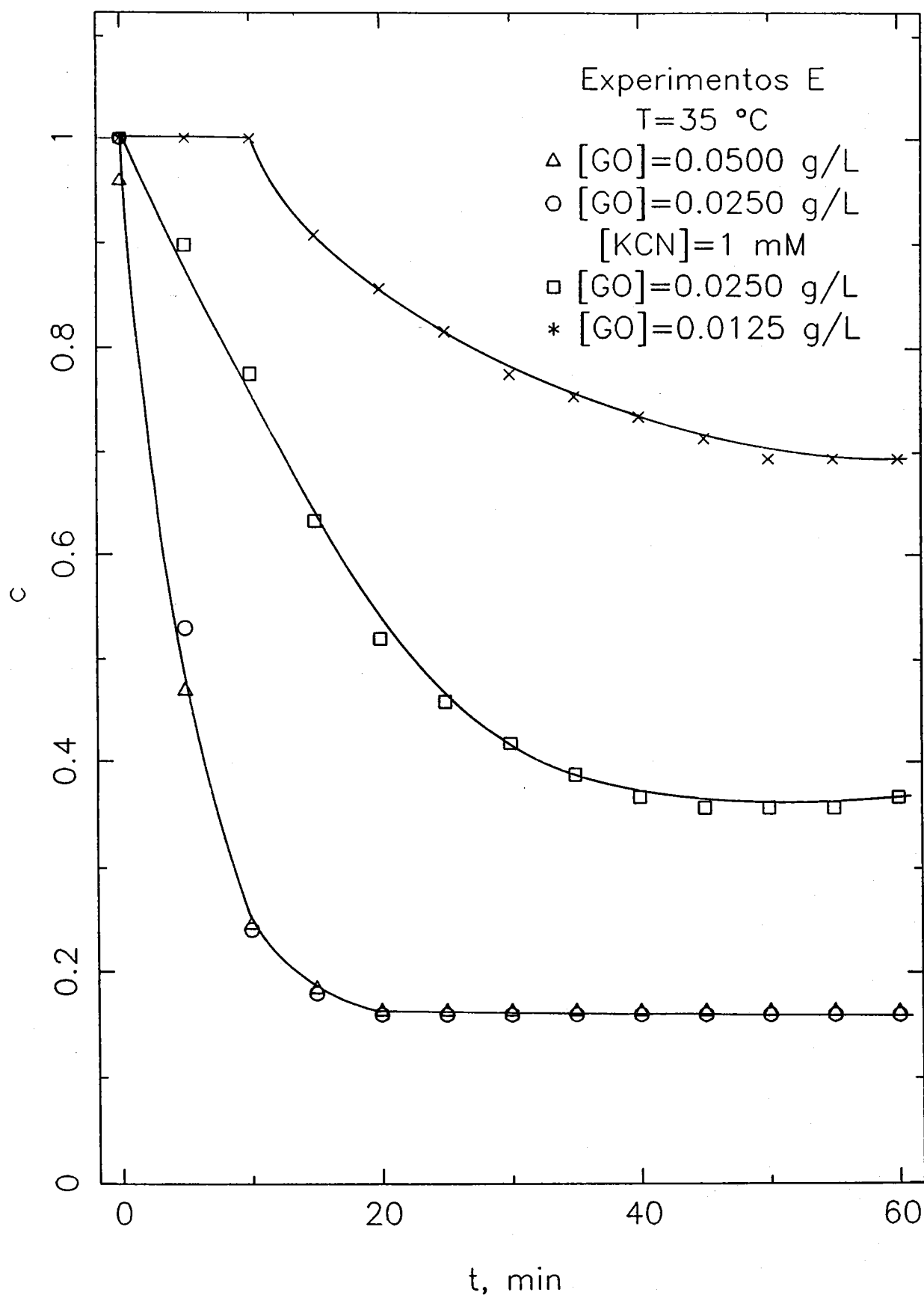


Figura 4.10

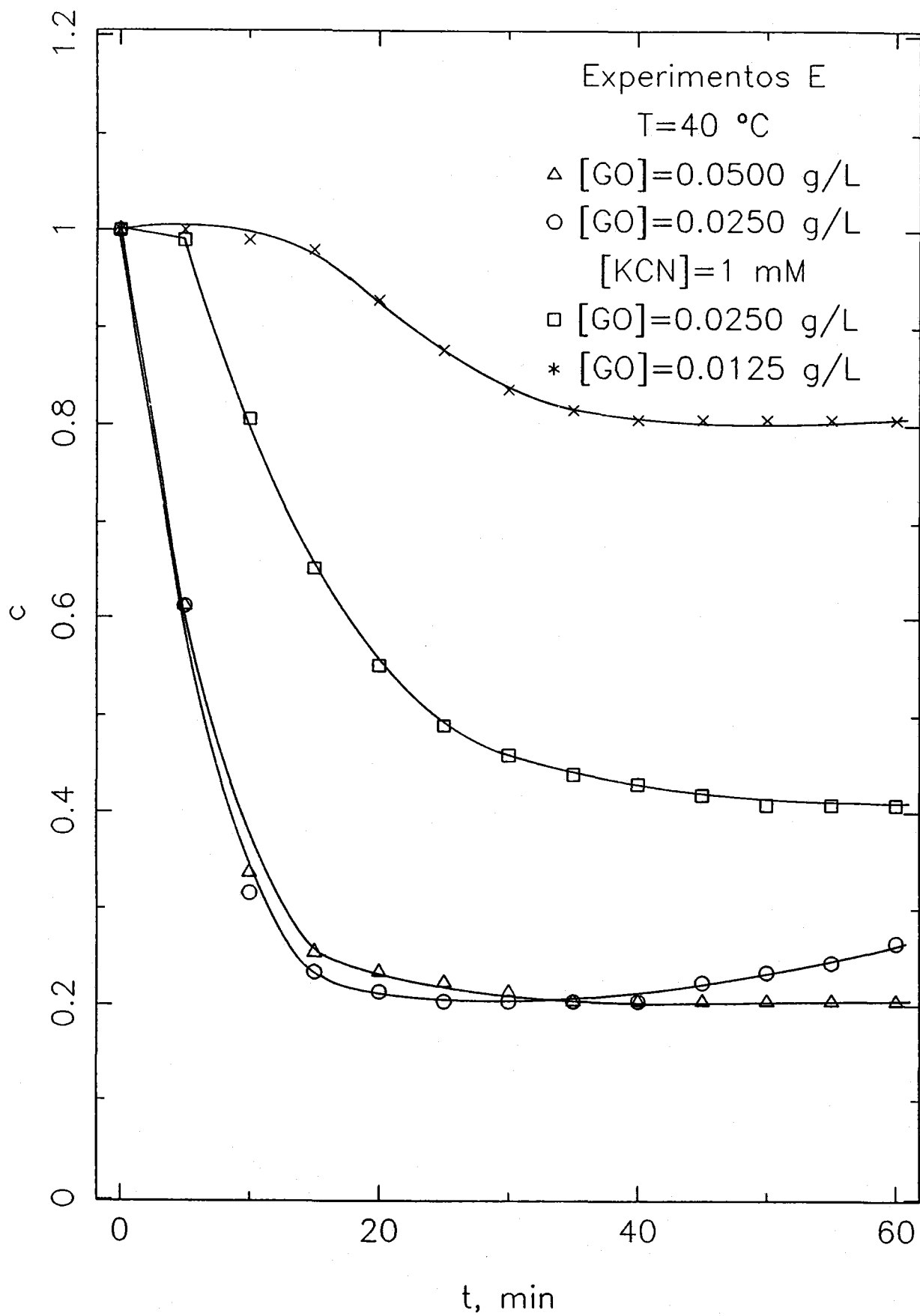


Figura 4.11

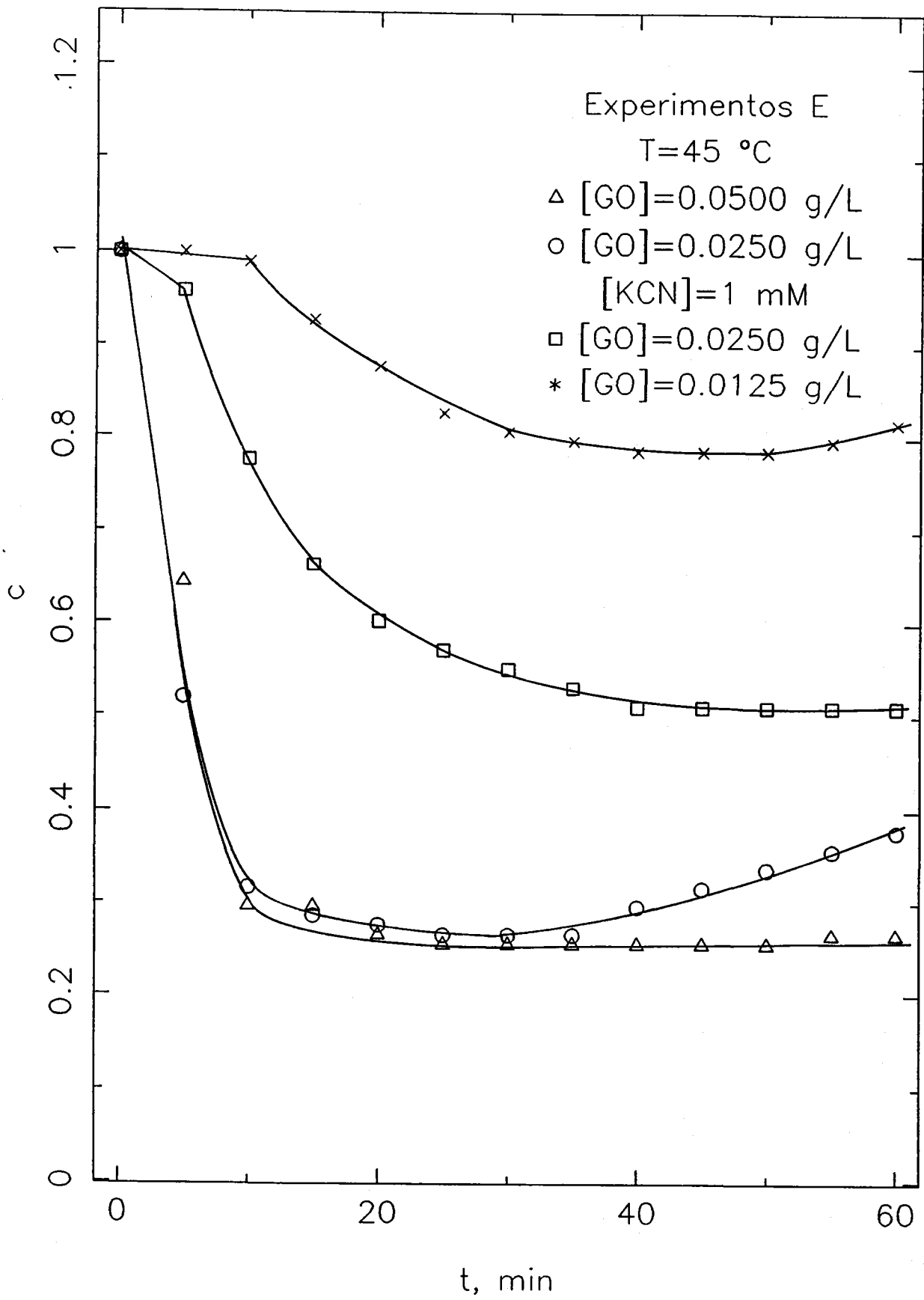
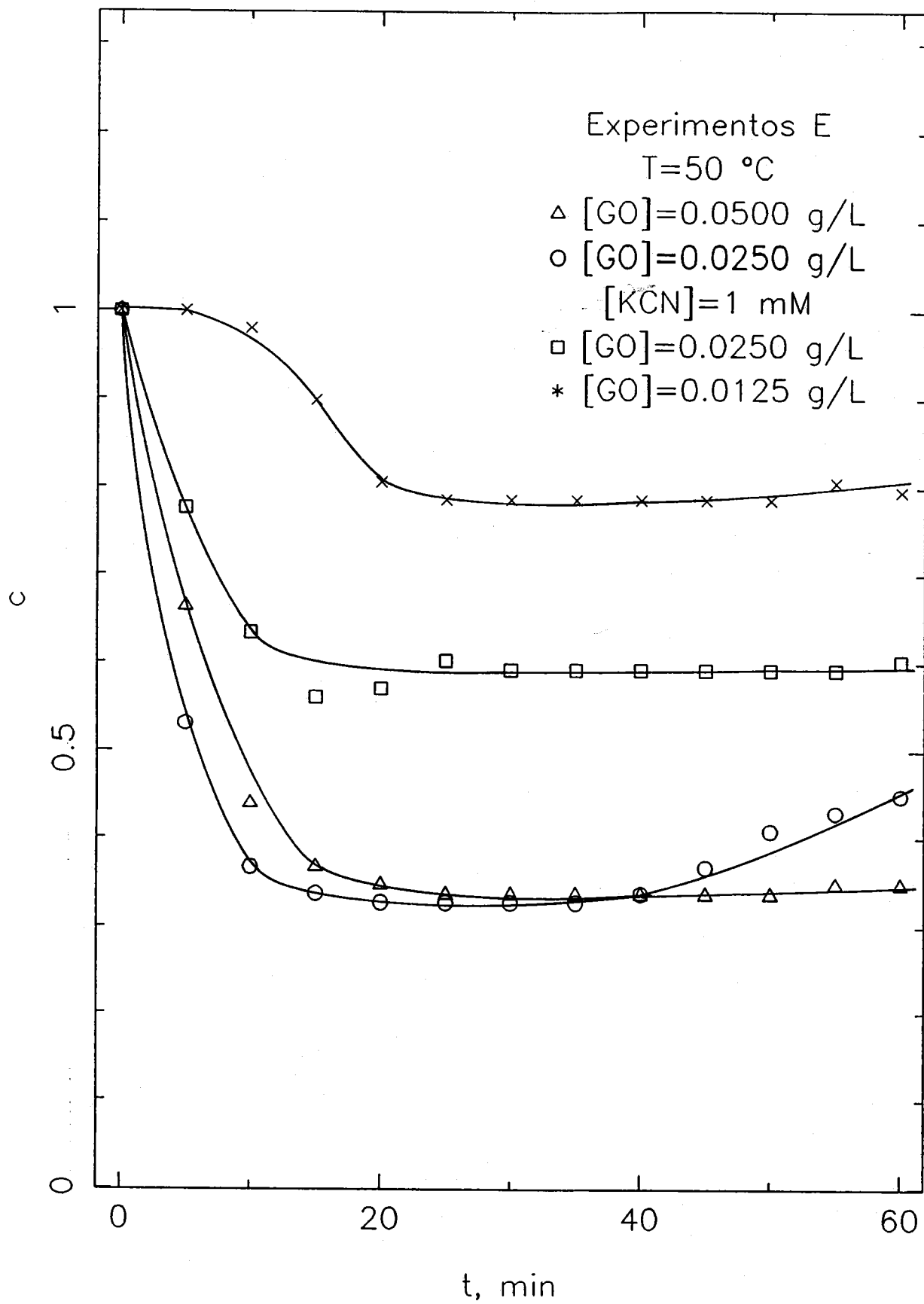


Figura 4.12



4.1.6. DESNATURALIZACION TERMICA DE LA GLUCOSA-OXIDASA

La desnaturalización térmica de la glucosa-oxidasa se estudió de forma independiente utilizando el método de Pifferi y col. (1981), modificado en la forma que se indica en la parte 3 de esta Memoria.

Para ello, se realizaron cuatro experimentos con una concentración inicial de glucosa-oxidasa de 2 g/L disuelta en tampón cítrico-citrato a pH = 5,55 y a la temperatura de 62, 64, 66 y 68 °C, respectivamente. Los resultados obtenidos conforman la tabla 4.47.

4.2. OXIDACION DE ALANINA CON OXIGENO MEDIANTE D-AMINOACIDO-OXIDASA

En el estudio experimental de este sistema, realizado en las condiciones óptimas de funcionamiento de esta enzima: tampón 0,1 M en fosfato de pH = 7,3, 39 °C y 100 cm³ de volumen de fase líquida, se analizaron únicamente la influencia de las concentraciones de D-aminoácido-oxidasa y de DL-alanina.

4.2.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE D-AMINOACIDO-OXIDASA

Con esta finalidad se realizaron cuatro experimentos, F.1 a F.4, utilizando DL-alanina como sustrato, en concentración 0,1 M, O₂ puro saturado con respecto de la fase líquida como fase gaseosa y en presencia de catalasa.

En ellos se cambia la concentración de D-aminoácido-oxidasa desde 0,25 a 1,50 g/L. Los resultados obtenidos se indican en las tablas 4.48 a 4.51 y se han representado en la figura 4.13.

TABLA 4.47

Desnaturalización térmica de la glucosa-oxidasa

Actividades relativas

<u>tiempo, min</u>	<u>T, °C</u>			
	<u>62</u>	<u>64</u>	<u>66</u>	<u>68</u>
10	0,898	0,817	0,698	0,565
20	0,841	0,734	0,629	0,510
30	0,813	0,697	0,553	---
40	0,770	0,655	0,498	0,308
50	0,717	0,593	0,400	0,216
60	---	0,538	---	---

TABLA 4.48

Experimento F.1

T = 39 °C pH = 7,3 P_T = 700,0 mm Hg
 Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,75 · 10⁻⁴ M
 [A0] = 0,25 g/L [CT] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	96,0
10	93,5
15	90,0
20	87,0
25	86,0
30	84,0
35	83,0
40	82,5
45	81,6
50	81,6
55	81,6
60	81,6

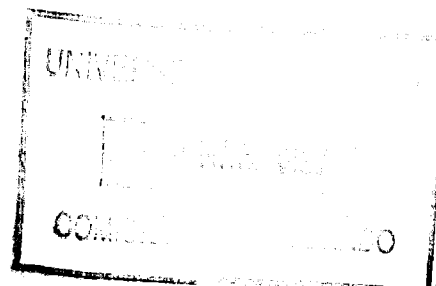


TABLA 4.49

Experimento F.2

T = 39 °C pH = 7,3 P_T = 700,0 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,75 · 10⁻⁴ M
[A₀] = 0,50 g/L [C_T] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	90,0
10	81,0
15	74,0
20	70,0
25	69,0
30	68,0
35	66,0
40	64,3
45	64,3
50	64,3
55	64,3
60	64,3

TABLA 4.50

Experimento F.3

T = 39 °C pH = 7,3 P_T = 700,0 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,75 · 10⁻⁴ M
[A0] = 1,00 g/L [CT] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	75,0
10	62,0
15	51,0
20	46,0
25	43,0
30	41,0
35	39,5
40	37,5
45	36,0
50	33,0
55	33,0
60	33,0

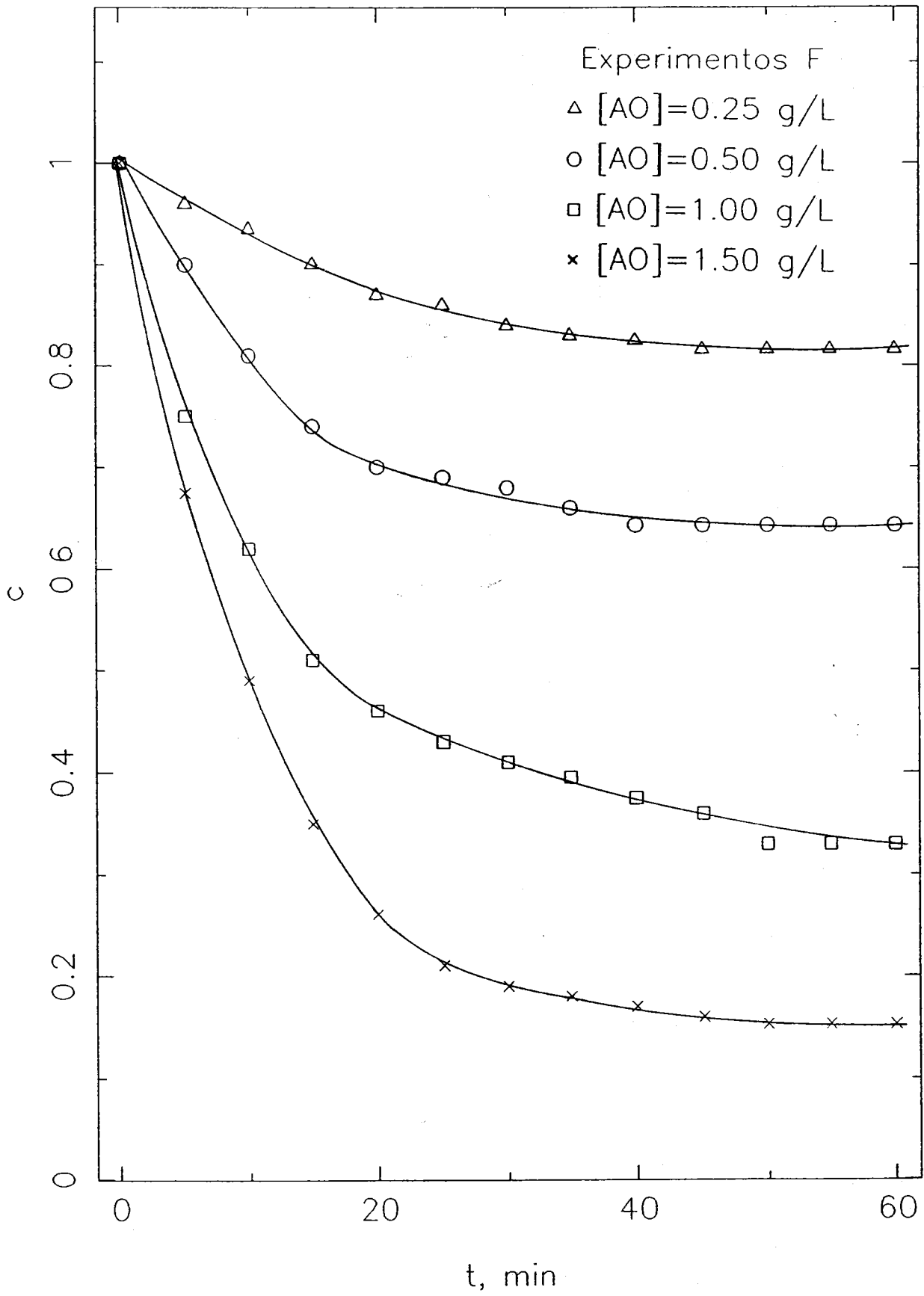
TABLA 4.51

Experimento F.4

T = 39 °C pH = 7,3 P_T = 700,0 mm Hg
Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,75 · 10⁻⁴ M
[A₀] = 1,50 g/L [C_T] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	67,5
10	49,0
15	35,0
20	26,0
25	21,0
30	19,0
35	18,0
40	17,0
45	16,0
50	15,3
55	15,3
60	15,3

Figura 4.13



4.2.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ALANINA

Para analizar la influencia de la concentración de sustrato, en la forma DL-alanina, se realizaron dos experimentos, F.5 y F.6, en las mismas condiciones anteriores con una concentración de D-aminoácido-oxidasa de 1,00 g/L y en presencia de catalasa.

En ellos se utiliza como concentraciones de DL-alanina los valores 0,05 y 0,2 M, respectivamente. Los resultados obtenidos se indican en las tablas 4.52 y 4.53, y se representan en la figura 4.14.

TABLA 4.52

Experimento F.5

T = 39 °C

pH = 7,3

P_T = 709,1 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,56 · 10⁻⁴ M

[A0] = 1,00 g/L [CT] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,20 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	76,5
10	58,0
15	42,5
20	32,5
25	27,0
30	25,0
35	24,0
40	23,0
45	22,0
50	21,0
55	21,0
60	21,0

TABLA 4.53

Experimento F.6

T = 39 °C

pH = 7,3

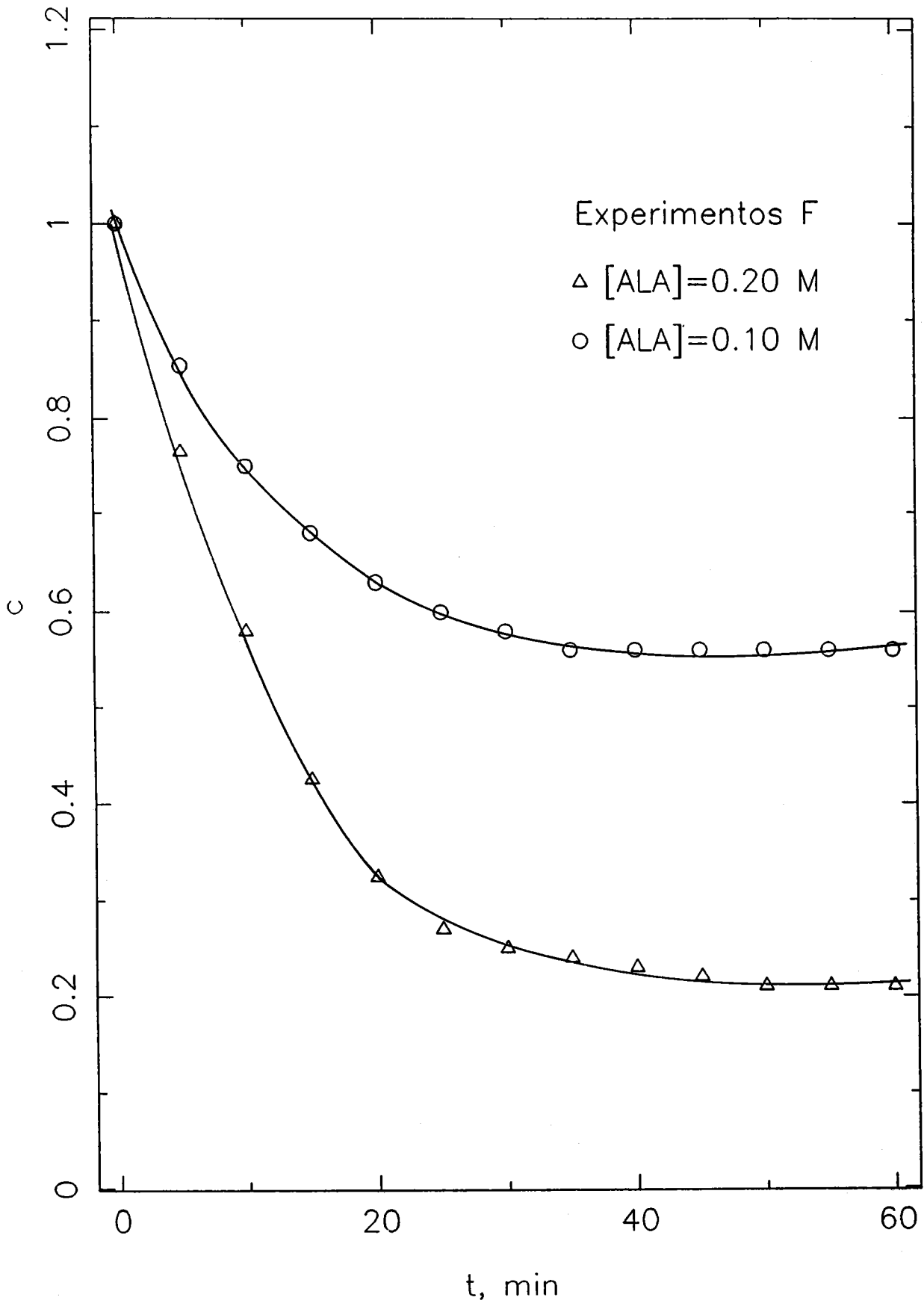
P_T = 709,1 mm Hg

Fase gaseosa: O₂ puro saturado [O₂]_i = 8,84 · 10⁻⁴ M

[A0] = 0,25 g/L [CT] = 0,0075 g/L [ALA] = 0,10 M

<u>tiempo, min</u>	<u>c.(100)</u>
0	100,0
5	85,5
10	75,0
15	68,0
20	63,0
25	60,0
30	58,0
35	56,0
40	56,0
45	56,0
50	56,0
55	56,0
60	56,0

Figura 4.14





5. DESARROLLO DE MODELOS CINETICOS

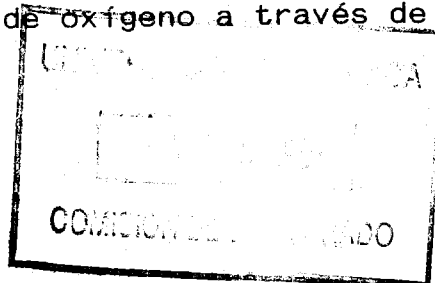


Para la interpretación de los experimentos realizados en el estudio de la absorción de oxígeno por disoluciones acuosas en las que tiene lugar una reacción enzimática, se han desarrollado dos tipos de modelos cinéticos:

- 1) Modelos de absorción gas-líquido, en los que se considera únicamente el mecanismo indirecto de disolución del oxígeno en la fase líquida y reacción enzimática posterior en el seno de la misma.
- 2) Modelos con absorción directa en la interfase, en los que al mecanismo anterior se añade un mecanismo directo de reacción con el oxígeno de la fase gaseosa de las moléculas de enzima adsorbidas en la interfase.

En ambos tipos de modelos se admiten las siguientes hipótesis:

- a) Mezcla perfecta de ambas fases fluidas, salvo en las proximidades de la interfase donde se considera aplicable la teoría de la película.
- b) Equilibrio interfacial, de manera que la concentración de oxígeno en la interfase corresponde a la saturación de la fase líquida con respecto a la fase gaseosa en la interfase.
- c) Régimen cinético de absorción, de manera que el consumo de oxígeno en la película interfacial es despreciable frente al caudal de oxígeno a través de la



misma y ambos procesos : transferencia gas-líquido y reacción en el seno de la fase líquida puede considerarse que transcurren en serie.

5.1. MODELOS DE ABSORCION GAS-LIQUIDO

Aunque estos modelos pueden aplicarse para cualquier reacción enzimática en la que intervenga el oxígeno molecular, para su desarrollo en esta Memoria nos referiremos en concreto a la oxidación de la glucosa por oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa.

En primer lugar, es preciso tener en cuenta que en la disolución acuosa la glucosa se encuentra en equilibrio entre sus dos formas cíclicas



ya que la forma abierta a través de la cual se produce el cambio indicado por [5.1] existe sólo en cantidades mínimas. Puesto que sólo la β -glucosa es oxidada por el oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa, cuando esta oxidación se produzca la disolución de glucosa dejará de estar en equilibrio y la α -glucosa se irá transformando en β -glucosa.

La cinética de la reacción de mutarrotación, [5.1], ha sido estudiada por Gram, Hveding y Reine (1973), ajustándose a una reacción de primer orden en ambos sentidos. A partir de los datos experimentales de estos autores, en el intervalo de 20 a 40 °C, se han obtenido las siguientes ecuaciones para la constante cinética directa, k_m , y la constante de equilibrio, K_m , en función de la temperatura absoluta:

$$k_m = 4,956 \cdot 10^{10} \exp[-70174/(R.T)], \text{ min}^{-1} \quad [5.2]$$

$$r^2 = 0,9999$$

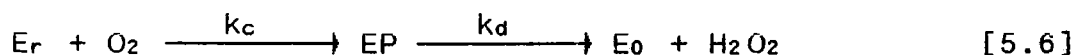
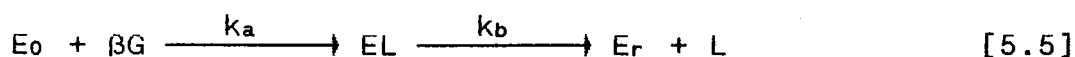
$$K_M = 1,0146 \exp[1269/(R.T)] \quad [5.3]$$

$$r^2 = 0,9980$$

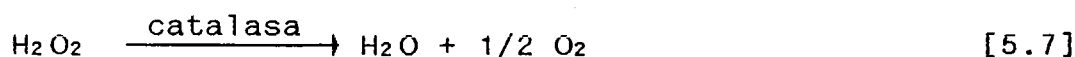
con R expresado en J/mol. Por tanto, al desaparecer la β -glucosa por oxidación, la velocidad de transformación de la forma α en la forma β , ($r_{\alpha\beta}$), será:

$$(r_{\alpha\beta}) = k_m ([\alpha G] - [\beta G]/K_M) \quad [5.4]$$

Como se ha indicado en la parte 2 de esta Memoria la oxidación de β -glucosa por oxígeno molecular catalizada por glucosa-oxidasa ha sido ampliamente estudiada tanto por métodos convencionales como por técnicas de mezcla rápida de las disoluciones de los reactivos y parece estar bien establecido que transcurre por un mecanismo ping-pong en el que la enzima pasa continuamente del estado oxidado al estado reducido y viceversa en un ciclo catalítico:



Suponiendo que los dos productos son rápidamente transformados: la lactona hidrolizada a ácido glucónico y el peróxido de hidrógeno descompuesto en presencia de catalasa



por lo que el consumo neto de oxígeno mediante la ecuación [5.6] equivaldrá a medio mol.

Aplicando al mecanismo expresado por las ecuaciones [5.5] y [5.6] la aproximación de estado estacionario para los intermedios en los que interviene la enzima:

$$\frac{d[E_0]}{dt} = k_d [EP] - k_a [E_0] [\beta G] \approx 0 \quad [5.8]$$

$$\frac{d[EL]}{dt} = k_a [E_0] [\beta G] - k_b [EL] \approx 0 \quad [5.9]$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_c [E_r] [O_2] - k_d [EP] \approx 0 \quad [5.10]$$

pueden expresarse las concentraciones de estado estacionario de todos ellos en función de uno solo:

$$[EP] = \frac{k_c}{k_d} [O_2] [E_r] \quad [5.11]$$

$$[E_0] = \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]} [E_r] \quad [5.12]$$

$$[EL] = \frac{k_c}{k_b} [O_2] [E_r] \quad [5.13]$$

Admitiendo que en las condiciones de operación no se produce desnaturalización de la enzima y realizando un balance de ésta

$$[E_r] = \frac{[GO]}{1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]}} \quad [5.14]$$

se obtiene para la velocidad de desaparición de β -glucosa

$$(-r_{\beta G}) = k_a [\beta G] [E_0] = \frac{k_c [O_2] [GO]}{1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]}}$$

que suele expresarse en la forma:

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.15]$$

siendo

$$r_{\max} = \frac{k_d k_b}{k_d + k_b} ; \quad K_{\beta G} = \frac{r_{\max}}{k_a} ; \quad K_{O_2} = \frac{r_{\max}}{k_c} \quad [5.16]$$

análogamente la velocidad de consumo de oxígeno

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} k_c [O_2] [E_r] = \frac{(1/2) r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.17]$$

de acuerdo con la estequiometría global de la reacción enzimática en presencia de catalasa.

Con este modelo cinético ha sido estudiado el sistema considerado en el trabajo clásico de Gibson, Swoboda y Massey (1964), cuyas conclusiones siguen siendo aceptadas actualmente. A partir de los datos experimentales de estos autores, realizados en el intervalo de 0 a 38 °C, se han obtenido las siguientes ecuaciones para las constantes cinéticas elementales, k_a a k_d , en función de la temperatura absoluta:

$$k_a = 3,33 \cdot 10^{12} \exp[-37545/(R.T)], \text{ L/(mol.min)} \quad [5.18]$$

$$r^2 = 0,9881$$

$$k_b = 1,30 \cdot 10^{20} \exp [-81046/(R.T)], \text{ min}^{-1} \quad [5.19]$$

$$k_c = 1,193 \cdot 10^{10} \exp[-11365/(R.T)], \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{min}) \quad [5.20]$$

$$r^2 = 0,9942$$

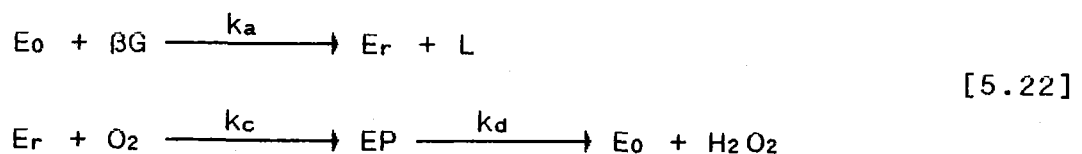
$$k_d = 1,475 \cdot 10^{10} \exp [-30378/(R.T)], \text{ min}^{-1} \quad [5.21]$$

$$r^2 = 0,9931$$

con R expresado en J/mol, no se indica el coeficiente de regresión para k_b porque la ecuación [5.19] está basada en sólo dos datos.

Con estas ecuaciones se han calculado los valores de r_{\max} , $K_{\beta G}$ y K_{O_2} que se indican en la tabla 5.1, junto con algunos otros resultados encontrados en la Bibliografía.

Si en el mecanismo expresado por las ecuaciones [5.5] y [5.6] la constante cinética k_b fuera muy grande con respecto a las otras, el intermedio EL no existiría prácticamente



y las ecuaciones [5.15] y [5.17] seguirían siendo válidas con

$$r_{\max} = k_d ; \quad K_{\beta G} = k_d/k_a ; \quad K_{O_2} = k_d/k_c \quad [5.23]$$

Análogamente si fuera muy grande la constante k_d con respecto a las otras

TABLA 5.1

Parámetros cinéticos de la reacción enzimática

<u>T, °C</u>	<u>r_{max}, min⁻¹</u>	<u>K_{0.5}, mol/L</u>	<u>K_{0.2}, mol/L</u>
25	63360	0,0736	0,000524
	(1) 86400	0,0692	0,000820
	(2) 58620	0,0679	0,000501
	(3) 68760	0,0717	0,000481
	(4) 69120	0,0518	0,000563
30	79425	0,0719	0,000609
	(5) 85980	0,0377	0,000537
	(6) 78540	0,0136	0,01148
35	98240	0,0698	0,000700
40	120175	0,0675	0,000798
45	145640	0,0652	0,000902
50	175090	0,0629	0,001015

(1) Bright y Gibson (1967)

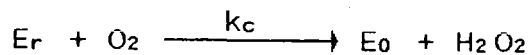
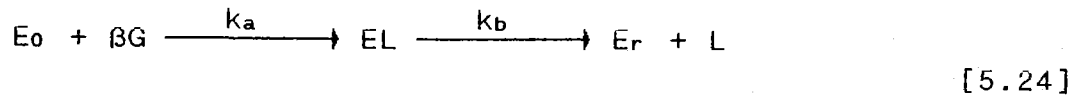
(2) Weibel y Bright (1971)

(3) Bright y Appleby (1969)

(4) Linek y col. (1980)

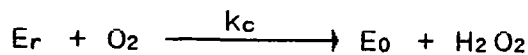
(5) Duke y col. (1969)

(6) Fukushima y col. (1978)



$$r_{max} = k_b ; \quad K_{\beta G} = k_b/k_a ; \quad K_{O_2} = k_b/k_c \quad [5.25]$$

Si simultáneamente se dan ambas circunstancias el mecanismo se reduce a



y en las ecuaciones [5.15] y [5.17] al hacerse muy grande el valor de r_{max} se hace despreciable el 1 del denominador

$$(-r_{\beta G}) = \frac{[GO]}{\frac{1}{k_a} \frac{1}{[\beta G]} + \frac{1}{k_d} \frac{1}{[O_2]}} = \frac{k_a [GO]}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}} \quad [5.27]$$

En el momento que el consumo de oxígeno determina que su concentración disminuya en el seno de la fase líquida se producirá su transferencia desde la interfase

$$N_{O_2.a} = k_L.a ([O_2]_i - [O_2]) \quad [5.28]$$

y si la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo en el seno de la fase líquida se sigue mediante la lectura de un electrodo de oxígeno, la respuesta de éste puede retrasarse con respecto a la concentración existente en cada instante en el seno de la fase líquida:

$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c) \quad [5.29]$$

donde la ecuación [5.29] se basa en suponer un retraso de primer orden como generalmente se admite.

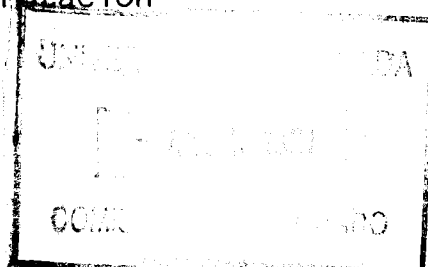
Las ecuaciones desarrolladas para los cuatro fenómenos que tienen lugar simultáneamente: mutarrotación, oxidación enzimática, transferencia de oxígeno y retraso del electrodo permiten formular el sistema de ecuaciones del modelo.

$$\begin{aligned} \frac{d[\alpha G]}{dt} &= - (r_{\alpha\beta}) \\ \frac{d[\beta G]}{dt} &= (r_{\alpha\beta}) - (-r_{\beta G}) \\ \frac{d[O_2]}{dt} &= N_{O_2} \cdot a - (-r_{O_2}) \\ \frac{dc}{dt} &= k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c) \end{aligned} \quad [5.30]$$

Si se parte de una disolución de glucosa saturada con respecto de la fase gaseosa y en el instante cero se introducen las enzimas, glucosa-oxidasa y catalasa, las condiciones iniciales serán:

$$t=0 \quad [\alpha G]=[\alpha G]_e ; \quad [\beta G]=[\beta G]_e ; \quad [O_2]=[O_2]_i ; \quad c=1 \quad [5.31]$$

El modelo anterior puede simplificarse si la velocidad de mutarrotación es muy grande con respecto de la oxidación enzimática, en cuyo caso la concentración de β -glucosa en cada instante corresponderá al equilibrio de mutarrotación



$$\frac{[\beta G]}{[\alpha G]} = K_M \quad [5.32]$$

y teniendo en cuenta el balance de glucosa

$$[\alpha G] + [\beta G] = [G] \quad [5.33]$$

$$[\beta G] = \frac{K_M}{1 + K_M} [G] \quad [5.34]$$

con lo que podrá sustituirse la concentración de β -glucosa en la ecuación de velocidad de la oxidación enzimática por la de glucosa incluyendo el factor, $K_M/(1 + K_M)$, constante a cada temperatura, en los parámetros cinéticos de la misma:

$$(-r_G) = \frac{r_{max} [GO]}{1 + K_G/[G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.35]$$

Siendo

$$K_G = K_{\beta G} \left[\frac{1 + K_M}{K_M} \right] \quad [5.36]$$

y el modelo [5.30] queda en la forma:

$$\frac{d[G]}{dt} = - (-r_G)$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = N_{O_2} \cdot a - (-r_{O_2}) \quad [5.37]$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c)$$

$$t=0 \quad [G]=[G]_0 ; \quad [O_2]=[O_2]_i ; \quad c=1$$

Análogamente si puede despreciarse el retraso del electrodo el modelo se simplifica aún más:

$$\frac{d[G]}{dt} = - (-r_G) \quad [5.38]$$

$$[O_2]_i \frac{dc}{dt} = N_{O_2} \cdot a - (-r_{O_2})$$

$$t=0 \quad [G]=[G]_0 ; \quad [O_2]=[O_2]_i$$

En este último caso, teniendo en cuenta la relación estequiométrica

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} (-r_G) \quad [5.39]$$

y eliminando la velocidad de reacción entre las dos ecuaciones diferenciales

$$\frac{d[G]}{dt} = 2 [O_2]_i \frac{dc}{dt} - 2 k_L \cdot a [O_2]_i (1 - c) \quad [5.40]$$

ecuación que puede integrarse teniendo en cuenta la condición inicial

$$d[G] = 2 [O_2]_i dc - 2 k_L \cdot a [O_2]_i (1 - c) dt$$

$$[G]_0 - [G] = 2 [O_2]_i \left[(1 - c) + k_L \cdot a \left(t - \int_0^t c dt \right) \right] \quad [5.41]$$

la ecuación [5.41] permite determinar la variación de la concentración de glucosa con el tiempo a partir de la variación de la

lectura del electrodo con el tiempo, c , si es conocido el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_L .a.

5.2. MODELOS CON ABSORCIÓN DIRECTA EN LA INTERFASE

Como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria los resultados experimentales de transferencia de oxígeno en sistemas biológicos, con microorganismos o biomoléculas que tienden a adsorberse en la interfase gas-líquido, sugieren la existencia de un mecanismo directo de absorción de oxígeno en la interfase en paralelo con el mecanismo considerado en el apartado anterior de disolución en la fase líquida y posterior consumo por la reacción enzimática.

La existencia de este mecanismo implicaría que las etapas de la ecuación [5.6] podrían realizarse también en la interfase con el concurso del oxígeno de la fase gaseosa y por tanto habría un flujo de la forma reducida de la enzima desde el seno de la fase líquida hacia la interfase y otro de la forma oxidada de la enzima desde la interfase al seno de la fase líquida, de igual magnitud, N_d .a.

Suponiendo una isoterma de adsorción de la enzima en la interfase gas-líquido tipo Langmuir:

$$\bar{e} = \frac{k_e \cdot a \text{ [GO]}}{1 + K_e \text{ [GO]}} \quad [5.42]$$

donde \bar{e} sería la concentración de enzima adsorbida en el equilibrio.

Aún admitiendo que en cada instante se mantiene el equilibrio de adsorción, puesto que se trata de un equilibrio dinámico, existirá un intercambio continuo de moléculas de enzima entre la

interfase y el seno de la fase líquida cuya velocidad vendrá dada por

$$r_i = k \bar{e} = \frac{k_i \cdot a \text{ [GO]}}{1 + K_e \text{ [GO]}} \quad [5.43]$$

Considérese también para simplificar que las formas oxidada y reducida de la enzima se adsorben con igual fuerza en la interfase, aunque si la forma reducida o la pared celular de un microorganismo creciendo en condiciones de limitación por oxígeno tuviera mayor tendencia a adsorberse en la interfase podría ser una forma natural de favorecer el mecanismo directo en las condiciones en que se hace necesario.

Parece lógico pensar que este intercambio de moléculas de enzima entre la interfase y el seno de la fase líquida determine un transporte neto de E_0 hacia el seno de la fase líquida y de E_r hacia la interfase que sea proporcional a la diferencia de tensión de oxígeno entre ambos ambientes

$$\begin{aligned} N_d \cdot a &= \frac{k_i \cdot a \text{ [GO]}}{1 + K_e \text{ [GO]}} ([O_2]_i - [O_2]) = \\ &= f(\text{[GO]}) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \end{aligned} \quad [5.44]$$

En el tratamiento cinético del mecanismo representado por las ecuaciones [5.5] y [5.6] este fenómeno supondría modificar las ecuaciones de la aproximación de estado estacionario de las formas oxidada y reducida de la enzima teniendo en cuenta este flujo neto:

$$\frac{d[E_0]}{dt} = k_d [EP] + N_d \cdot a - k_a [E_0] [\beta G] \approx 0 \quad [5.45]$$

$$\frac{d[Er]}{dt} = k_b [EL] - N_d \cdot a - k_c [Er] [O_2] \approx 0 \quad [5.46]$$

con lo que las concentraciones de estado estacionario de los intermedios serían:

$$[EP] = \frac{k_c}{k_d} [O_2] [Er] \quad [5.47]$$

$$[EL] = \frac{k_c}{k_b} [O_2] [Er] + \frac{N_d \cdot a}{k_b} \quad [5.48]$$

$$[Eo] = \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]} [Er] + \frac{N_d \cdot a}{k_a [\beta G]} \quad [5.49]$$

y el balance de enzima:

$$[GO] = \left[1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]} \right] [Er] + N_d \cdot a \left[\frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_a [\beta G]} \right] \quad [5.50]$$

que conduce a las siguientes expresiones para las concentraciones de estado estacionario de las formas oxidada y reducida de la enzima:

$$[Er] = \frac{[GO] - N_d \cdot a \left[\frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_a [\beta G]} \right]}{1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c}{k_a} \frac{[O_2]}{[\beta G]}} \quad [5.51]$$

$$[E_0] = \frac{1}{k_a [\beta G]} \frac{k_c [O_2] [GO] + N_d . a \left[1 + \frac{k_c [O_2]}{k_d} \right]}{1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c [O_2]}{k_a [\beta G]}} \quad [5.52]$$

De acuerdo con estos resultados la velocidad de desaparición de β -glucosa vendrá dada por

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO] + N_d . a \left[\frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{r_{\max}}{k_d} \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.53]$$

y la de consumo de oxígeno

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - N_d . a \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{r_{\max}}{k_b} \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.54]$$

Obsérvese que las ecuaciones [5.53] y [5.54] indican que en el seno de la fase líquida la velocidad de consumo de glucosa es superior al doble de la velocidad de consumo de oxígeno, debido al aporte extra de oxígeno por la enzima que lo adsorbe directamente en la interfase. Evidentemente, debe cumplirse que

$$(-r_{\beta G}) - 2 (-r_{O_2}) = N_d . a \quad [5.55]$$

como puede comprobarse mediante las ecuaciones [5.53] y [5.54]. Los valores de (r_{\max}/k_d) y de (r_{\max}/k_b) calculados mediante las ecuaciones [5.16], [5.19] y [5.21] se indican en la tabla 5.2.

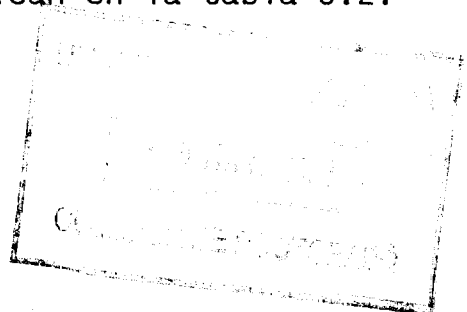


TABLA 5.2

T, °C	(r _{max} /k _d)	(r _{max} /k _b)
25	0,919	0,081
30	0,941	0,059
35	0,957	0,043
40	0,968	0,032
45	0,976	0,024
50	0,982	0,018

Mediante [5.44] las ecuaciones de velocidad [5.53] y [5.54] quedan en la forma

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO] + f([GO]) \cdot a([O_2]_i - [O_2]) \left[\frac{K_{O_2}}{[O_2]} + K \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.56]$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - f([GO]) \cdot a([O_2]_i - [O_2]) \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 - K \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.57]$$

Siendo

$$K = r_{\max}/k_d \quad [5.58]$$

Para el mecanismo representado por las ecuaciones [5.22], las ecuaciones [5.56] y [5.57] quedan en la forma

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO] + f([GO]) \cdot a([O_2]_i - [O_2]) \left[\frac{K_{O_2}}{[O_2]} + 1 \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.59]$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - f([GO]) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]}}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.60]$$

donde r_{\max} , $K_{\beta G}$ y K_{O_2} vienen dados por las ecuaciones [5.23].

Para el mecanismo representado por las ecuaciones [5.24], las ecuaciones anteriores quedan en la forma:

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO] + f([GO]) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \frac{K_{O_2}}{[O_2]}}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.61]$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - f([GO]) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [5.62]$$

donde r_{\max} , $K_{\beta G}$ y K_{O_2} vienen ahora definidos por las ecuaciones [5.25].

Un tratamiento semejante para el mecanismo de la reacción enzimática representada por las ecuaciones [5.26] conduce a

$$\frac{d[E_0]}{dt} = - \frac{d[E_r]}{dt} = k_c [E_r] [O_2] + N_d \cdot a - k_a [E_0] [\beta G] \approx 0$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{k_a [GO] + \frac{k_a}{k_c} \frac{N_d \cdot a}{[O_2]}}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}}$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [GO] - \frac{N_d \cdot a}{[\beta G]}}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}}$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{k_a [GO] + \frac{k_a}{k_c} f([GO]) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \frac{1}{[O_2]}}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}} \quad [5.63]$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [GO] - f([GO]).a ([O_2]_i - [O_2]) \frac{1}{[BG]}}{\frac{1}{[BG]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}} \quad [5.64]$$

En el modelo simplificado, considerando establecido en cada instante el equilibrio de mutarrotación y despreciando el retraso del electrodo, la relación [5.55] permite establecer

$$\frac{d[G]}{dt} = 2 [O_2]_i \frac{dc}{dt} - 2 k_L . a [O_2]_i (1 - c) - N_d . a$$

$$[G]_0 - [G] = [O_2]_i \left[2 (1 - c) + (2 k_L . a + \right.$$

$$\left. + f([GO]).a) (t - \int_0^t c dt) \right] \quad [5.65]$$

El modelo desarrollado anteriormente se basa en suponer que el flujo neto de oxígeno debido al mecanismo directo puede expresarse mediante la ecuación [5.44] y como se ha visto las velocidades de consumo de β -glucosa y de oxígeno, ecuaciones [5.53] y [5.54] ó [5.56] y [5.57], quedan alteradas en su numerador por un término positivo en las de consumo de glucosa y un término negativo en las de consumo de oxígeno en el seno de la fase líquida.

Otra forma de abordar el problema sería suponer que el flujo neto de la forma oxidada de la enzima desde la interfase al seno de la fase líquida es proporcional a la concentración de la forma reducida de la enzima en el seno de la fase líquida, de manera que las aproximaciones de estado estacionario de E_o y E_r , ecuaciones [5.45] y [5.46], quedan en la forma:

$$\frac{d[E_o]}{dt} = k_d [EP] + k_i . a [E_r] - k_a [E_o] [BG] \approx 0 \quad [5.66]$$

$$\frac{d[Er]}{dt} = k_b [EL] - k_i . a [Er] - k_c [Er] [O_2] \approx 0 \quad [5.67]$$

donde $k_i . a$ podría depender de las condiciones de operación. En estas condiciones las concentraciones de estado estacionario de los intermedios serían

$$[EP] = \frac{k_c}{k_d} [O_2] [Er] \quad [5.68]$$

$$[EL] = \frac{k_c [O_2] + k_i . a}{k_b} [Er] \quad [5.69]$$

$$[E_0] = \frac{k_c [O_2] + k_i . a}{k_a [\beta G]} [Er] \quad [5.70]$$

con lo que mediante el balance de enzima

$$[Er] = \frac{[GO]}{1 + \left[\frac{k_c}{k_d} + \frac{k_c}{k_b} \right] [O_2] + \frac{k_c [O_2]}{k_a [\beta G]} + k_i . a \left[\frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_a [\beta G]} \right]} \quad [5.71]$$

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{max} [GO]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i . a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 - K \right]} \quad [5.72]$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{max} [GO] \left[1 + \frac{k_i . a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \right]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i . a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 - K \right]} \quad [5.73]$$

Estas ecuaciones son aplicables al mecanismo [5.22] haciendo $K = 1$ y utilizando las ecuaciones [5.23] para relacionar r_{max} , $K_{\beta G}$ y K_{O_2} con las constantes cinéticas elementales.

Para el mecanismo [5.24] también serían aplicables, sin más que hacer $K = 0$ y utilizar las ecuaciones [5.25] con el mismo objetivo que las [5.23] en el caso anterior.

Para el mecanismo [5.26] se reducen a

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [GO]}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2] [\beta G]}} \quad [5.74]$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{max} [GO] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \right]}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2] [\beta G]}} \quad [5.75]$$

Para estos modelos puede comprobarse que

$$\begin{aligned} (-r_{\beta G}) - 2 (-r_{O_2}) &= \\ &= \frac{\frac{k_i \cdot a}{k_c} [GO]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 - K \right]} \end{aligned} \quad [5.76]$$

ecuación que no permite relacionar la variación de la concentración de glucosa con la de oxígeno de una forma tan sencilla como las ecuaciones [5.41] y [5.65].

5.3. MODELOS SIMPLIFICADOS PARA EL ESTADO CUASI-ESTACIONARIO

En los experimentos realizados, cuyos datos primarios se indican en la parte 4 de esta Memoria, establecidas las condiciones de cada experimento: temperatura, pH, composición de la fase líquida y composición de la fase gaseosa; se introducían

Las enzimas: glucosa-oxidasa y catalasa en el instante inicial y se seguía la variación de la lectura del electrodo de oxígeno con el tiempo.

La lectura del electrodo evoluciona con el tiempo en la forma indicada en la figura 5.1.

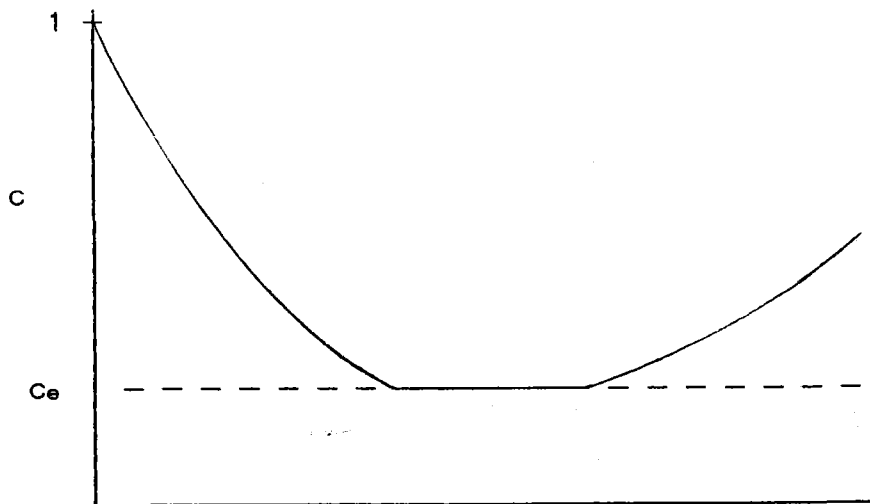


Figura 5.1

alcanzándose un estado cuasi-estacionario en el que la lectura del electrodo permanece prácticamente constante durante un cierto tiempo, hasta que la disminución de la concentración de glucosa determina que la lectura del electrodo suba lentamente de nuevo.

Los modelos desarrollados anteriormente se simplifican considerablemente aplicados al estado cuasi-estacionario ya que el retraso del electrodo no influye en el mismo y admitiendo que la velocidad de mutarrotación es grande comparada con la oxidación enzimática de la β -glucosa puede considerarse que en cada instante se mantiene el equilibrio de mutarrotación, con lo que el balance de oxígeno se reduce a

$$(N_{O_2} \cdot a)_e = (-r_{O_2})_e \quad [5.77]$$

que para el modelo de absorción gas-líquido se reduce a

$$k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = \frac{(1/2) r_{max} [GO]}{1 + K_G/[G]_e + K_{O_2}/[O_2]_e} \quad [5.78]$$

y aplicando la ecuación [5.41] al periodo cuasi-estacionario

$$[G]_e = [G]_0 - 2 [O_2]_i \left[(1 - c_e) + k_L \cdot a (t_e - \int_0^{t_e} c \, dt) \right] \quad [5.79]$$

puede determinarse la concentración de glucosa en el mismo.

Análogamente para el modelo con absorción directa en la interfase basado en la ecuación [5.44], la ecuación [5.77] conduce a

$$k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = \frac{r_{max} [GO] - f([GO]) \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) \left[\frac{K_G}{[G]_e} + 1 - K \right]}{1 + K_G/[G]_e + K_{O_2}/[O_2]_e} \quad [5.80]$$

y aplicando la ecuación [5.65] al periodo cuasi-estacionario

$$[G]_e = [G]_0 - [O_2]_i \left[2 (1 - c_e) + (2 k_L \cdot a + f([GO]_m) \cdot a) (t_e - \int_0^{t_e} c \, dt) \right] \quad [5.81]$$

Finalmente utilizando en [5.77] la ecuación [5.72] se obtiene

$$\begin{aligned}
 & k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = & [5.82] \\
 = & \frac{(1/2) r_{\max} [GO]}{1 + \frac{K_G}{[G]_e} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]_e} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2]_e} \left[\frac{K_G}{[G]_e} + 1 - K \right]}
 \end{aligned}$$

aunque en este caso, como ya se ha indicado, la relación entre $(-r_G)$ y $(-r_{O_2})$ no permite obtener una ecuación aplicable para el cálculo de la concentración de glucosa en el periodo cuasi-estacionario equivalente a las ecuaciones [5.79] y [5.81].

En la tabla 5.3 se resumen los modelos cinéticos desarrollados en este apartado.

TABLA 5.3

OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA
DE GLUCOSA-OXIDASA Y CATALASA

MODELO CINETICO

$$\frac{d[\alpha G]}{dt} = -k_m ([\alpha G] - [\beta G]/K_M)$$

$$\frac{d[\beta G]}{dt} = k_m ([\alpha G] - [\beta G]/K_M) - (-r_{\beta G})$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) - (-r_{O_2})$$

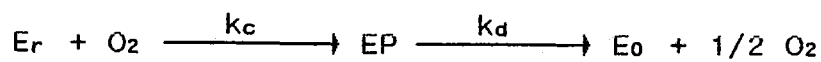
$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c)$$

$$t=0 \quad [\alpha G] = \frac{[G]_0}{1 + K_M} ; \quad [\beta G] = \frac{K_M [G]_0}{1 + K_M} ; \quad [O_2] = [O_2]_i ; \quad c=1$$

MODELOS DE ABSORCION GAS-LIQUIDO

$$(-r_{\beta G}) = 2 (-r_{O_2})$$

Mecanismo 1:

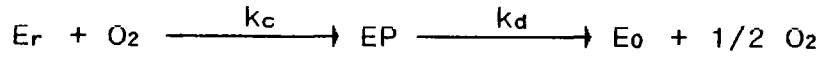
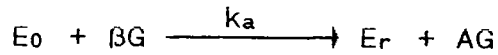


$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

$$r_{max} = \frac{k_d k_b}{k_d + k_b} ; \quad K_{\beta G} = \frac{r_{max}}{k_a} ; \quad K_{O_2} = \frac{r_{max}}{k_c}$$

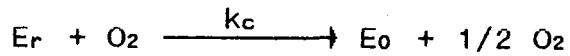
TABLA 5.3 (continuación)

Mecanismo 2:



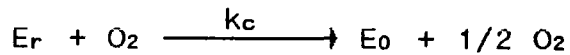
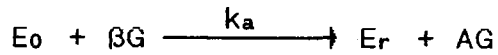
$$r_{max} = k_d ; \quad K_{\beta G} = k_d/k_a ; \quad K_{O_2} = k_d/k_c$$

Mecanismo 3:



$$r_{max} = k_b ; \quad K_{\beta G} = k_b/k_a ; \quad K_{O_2} = k_b/k_c$$

Mecanismo 4:



$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [GO]}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}}$$

MODELOS CON ABSORCION DIRECTA EN LA INTERFASE

A) Flujo neto de E_r hacia la interfase y de E_0 hacia el seno del líquido:

$$N_{d.a} = F(T, pH, [GO], [O_2]_i, [O_2], [G]).a$$

$$(-r_{\beta G}) = 2 (-r_{O_2}) + N_{d.a}$$

TABLA 5.3 (continuación)

Mecanismo 1:

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - N_d \cdot a \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{r_{\max}}{k_b} \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

Mecanismo 2:

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - N_d \cdot a \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]}}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

Mecanismo 3:

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO] - N_d \cdot a \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 \right]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

Mecanismo 4:

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [GO] - \frac{k_a}{k_c} N_d \cdot a \frac{1}{[\beta G]}}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]}}$$

B) $N_d \cdot a = k_i \cdot a [E_r]$

$$k_i \cdot a = G(T, pH, [O_2]_i, [O_2], [G]) \cdot a$$

Mecanismo 1:

$$(-r_{O_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{r_{\max}}{k_b} \right]}$$

TABLA 5.3 (continuación)

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [\text{GO}] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \right]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{r_{\max}}{k_b} \right]}$$

Mecanismo 2:

$$(-r_{\text{O}_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [\text{GO}]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]}}$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [\text{GO}] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \right]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]}}$$

Mecanismo 3:

$$(-r_{\text{O}_2}) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [\text{GO}]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 \right]}$$

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [\text{GO}] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \right]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{\text{O}_2}}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \left[\frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + 1 \right]}$$

Mecanismo 4:

$$(-r_{\text{O}_2}) = \frac{1}{2} \frac{k_a [\text{GO}]}{\frac{1}{[\beta G]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[\text{O}_2]} \frac{1}{[\beta G]}}$$

TABLA 5.3 (continuación)

$$(-r_{BG}) = \frac{k_a [GO] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} \right]}{\frac{1}{[BG]} + \frac{k_a}{k_c} \frac{1}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{1}{[O_2] [BG]}}$$

MODELO CINETICO SIMPLIFICADO

Se admiten las hipótesis:

- Equilibrio de mutarrotación
- Retraso despreciable del electrodo

$$\frac{d[G]}{dt} = - (-r_G)$$

$$[O_2]_i \frac{dc}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) - (-r_{O_2})$$

$$t=0 \quad [G]=[G]_0 ; \quad c=1$$

mismas ecuaciones anteriores sustituyendo

$$[BG] = \frac{K_M}{1 + K_M} [G] \quad K_{BG} = \frac{K_M}{1 + K_M} K_G$$

MODELO CINETICO SIMPLIFICADO APLICADO

AL ESTADO CUASI-ESTACIONARIO

$$k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = (-r_{O_2})_e$$

$$[G]_e = [G]_0 - \int_0^{t_e} (-r_G) dt$$

TABLA 5.3 (continuación)

MODELO DE ABSORCION GAS-LIQUIDO

$$[O_2]_i \frac{dc}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) + \frac{1}{2} \frac{d[G]}{dt}$$

MODELO CON ABSORCION DIRECTA EN LA INTERFASE

A)
$$[O_2]_i \frac{dc}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) + \frac{1}{2} \frac{d[G]}{dt} + \frac{1}{2} N_d \cdot a$$

6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS



6.1. OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA DE GLUCOSA-OXIDASA

Para la interpretación de los resultados experimentales obtenidos con este sistema se aplicó, en primer lugar, el modelo de absorción gas-líquido simplificado para el estado cuasi-estacionario

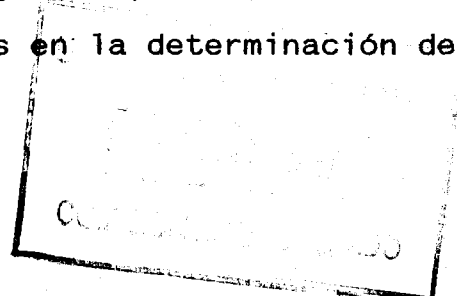
$$k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = \frac{1}{n-1} \frac{r_{max} [G]_0}{K_G/[G]_e + K_{O_2}/[O_2]_e} \quad [6.1]$$

$$[G]_e = [G]_0 - n [O_2]_i \left[(1 - c_e) + k_L \cdot a (t_e - \int_0^{t_e} c \, dt) \right] \quad [6.2]$$

donde n tomará los valores 1 ó 2 dependiendo de la ausencia o presencia de catalasa, respectivamente. Puesto que en la ecuación [6.1] se utiliza la concentración inicial de enzima, este modelo implica admitir, además de las hipótesis en que está basado, que en el tiempo requerido para alcanzar el estado cuasi-estacionario, t_e , no se produce desnaturalización apreciable de la enzima.

6.1.1. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE LA FASE LIQUIDA

La influencia de la composición de la fase líquida se estudió a 25 °C y pH = 5,55, con oxígeno puro saturado previamente con respecto de la fase líquida y en las mismas condiciones fluidodinámicas (caudal de fase gaseosa, volumen de fase líquida y grado de agitación) utilizadas en la determinación del



coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

$$k_L \cdot a = 0,033 \text{ min}^{-1}$$

a.- Influencia de la concentración de glucosa-oxidasa

En la serie A de experimentos se analiza la influencia de la concentración de glucosa-oxidasa, en ausencia de catalasa, y con una concentración inicial de glucosa constante de 0,10 M.

Dado que en el experimento A.1, correspondiente a la máxima concentración de glucosa-oxidasa, el estado cuasi-estacionario se alcanza antes de los 30 minutos, el máximo consumo de glucosa en estos experimentos será

$$([G]_0 - [G]_e)_{\text{máximo}} = [O_2]_i (1 + k_L \cdot a \cdot t_e) = 0,002 \text{ M}$$

que representa un 2 % de la glucosa inicial, por lo que en esta serie puede considerarse constante la concentración de glucosa e igual a su valor inicial. Teniendo en cuenta esta circunstancia y reagrupando la ecuación [6.1] en la forma

$$\begin{aligned} y &= \frac{[GO]_0}{n k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e)} = \\ &= \frac{1}{r_{\text{max}}} + \frac{K_G}{r_{\text{max}}} \frac{1}{[G]_0} + \frac{K_{O_2}}{r_{\text{max}}} \frac{1}{[O_2]_e} \end{aligned} \quad [6.3]$$

se observa que para la serie considerada se reduce a

$$y = k_1 + k_2 \frac{1}{[O_2]_e} \quad [6.4]$$

siendo

$$k_1 = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_G}{r_{\max}} \frac{1}{0,10} \quad y \quad k_2 = \frac{K_{O_2}}{r_{\max}} \quad [6.5]$$

Con objeto de comprobar la ecuación [6.4] a partir de los datos primarios de los experimentos de la serie A se han calculado los valores que se indican en la tabla 6.1.

TABLA 6.1

Influencia de la concentración de glucosa-oxidasa

Exp	$[GO]_0$, g/L	c_e	$[O_2]_i$, M	y	$(1/[O_2]_e) \cdot 10^{-4}$
A.1	0,05000	0,045	0,000991	1601	2,242
A.2	0,02500	0,102	0,000992	850	0,988
A.3	0,01250	0,204	0,000995	478	0,493
A.4	0,00625	0,469	0,000994	359	0,215
A.5	0,00500	0,520	0,000995	317	0,193

Los valores de y obtenidos se han representado frente a $1/[O_2]_e$ en la figura 6.1 en la que se observa que se ajustan bien a la ecuación [6.4]. Por regresión lineal se obtiene

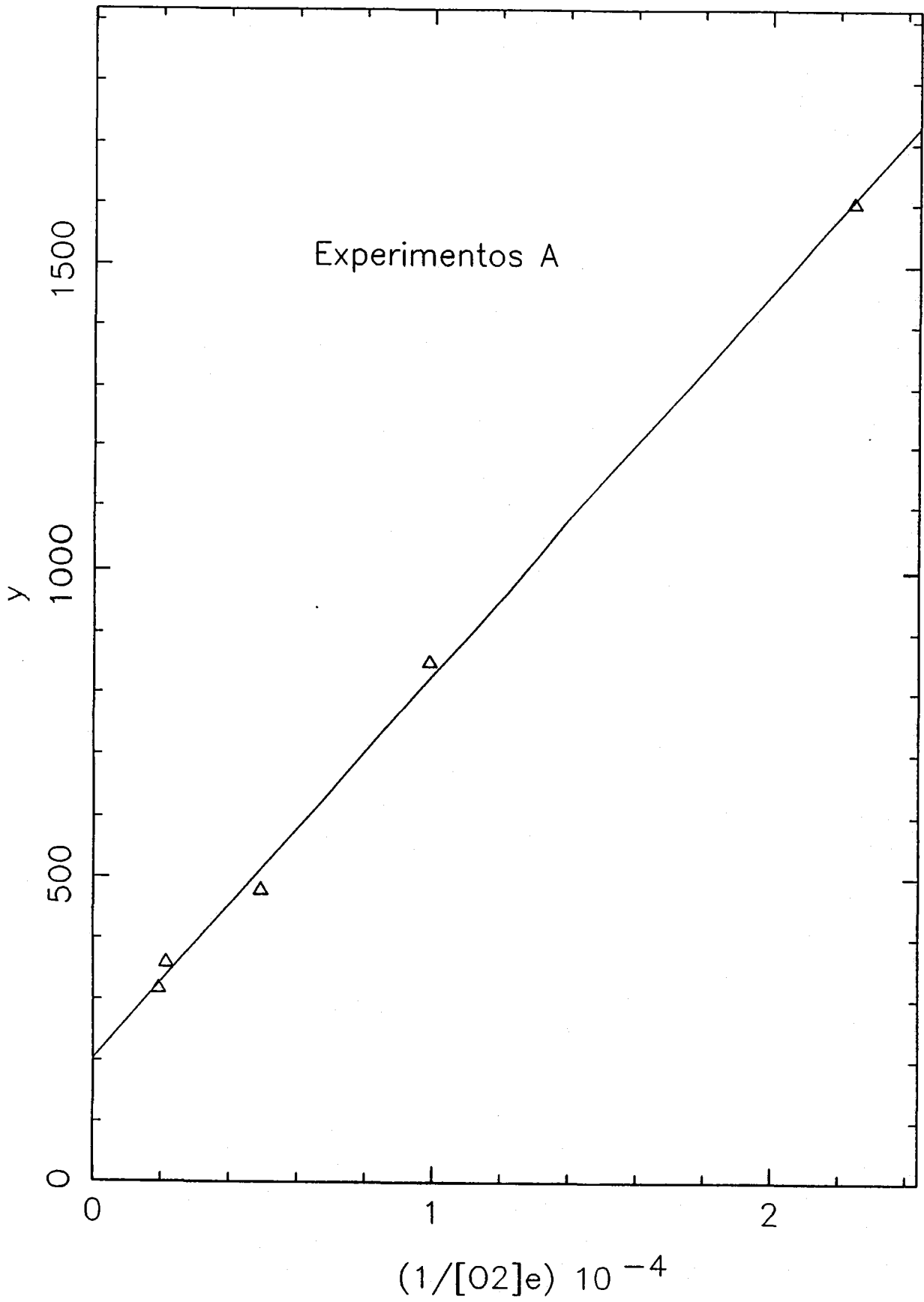
$$y = 204 + 0,0626 (1/[O_2]_e) \quad [6.6]$$

$$r^2 = 0,998$$

b.- Influencia de la concentración de catalasa

En la serie B de experimentos se analiza la influencia de la concentración de catalasa, manteniéndose constante la concentración inicial de glucosa-oxidasa y de glucosa, 0,025 g/L y 0,1 M respectivamente.

Figura 6.1



Los resultados obtenidos a partir de los datos primarios de estos experimentos, utilizando $n = 2$, se indican en la tabla 6.2.

TABLA 6.2

Influencia de la concentración de catalasa

Exp	$[CT]_0$, g/L	c_e	$[O_2]_i$, M	y	$(1/[O_2]_e) \cdot 10^{-4}$
B.1	0,30000	0,204	0,000992	480	0,494
B.2	0,01500	0,214	0,001004	480	0,465
B.3	0,00750	0,214	0,001003	480	0,466
B.4	0,00375	0,204	0,001003	474	0,489

Se observa en esta tabla que los cuatro experimentos conducen prácticamente a los mismos resultados a pesar de que la concentración de catalasa varía desde 0,00375 g/L a 0,30000 g/L, indicando que la concentración más pequeña es suficiente para descomponer rápidamente todo el peróxido de hidrógeno formado.

Por otra parte, comparando estos resultados con los del experimento A.3, se observa que son coincidentes lo que confirma que en ausencia de catalasa la estequiometría es



y por tanto, $n = 1$, mientras que en presencia de catalasa es



y por tanto, $n = 2$. Este resultado también indica que el peróxido de hidrógeno formado en los experimentos A, hasta que se alcanza el estado cuasi-estacionario, no es suficiente para influir en la

cinética del proceso.

No obstante, con objeto de asegurar la descomposición total del peróxido de hidrógeno en todos los experimentos posteriores se utilizó una concentración de catalasa de 0,00750 g/L, superior a la mínima determinada.

c.- Influencia de la concentración de glucosa

En la serie C de experimentos se analiza la influencia de la concentración de glucosa, manteniéndose constantes las concentraciones de enzimas

$$[GO]_0 = 0,050 \text{ g/L y } [CT]_0 = 0,0075 \text{ g/L}$$

y variando la concentración inicial de glucosa en el intervalo de 0,200 a 0,005 M.

Teniendo en cuenta las ecuaciones [6.3] y [6.4]

$$y' = y - 0,0626 \frac{1}{[O_2]_e} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_G}{r_{\max}} \frac{1}{[G]_0} \quad [6.9]$$

admitiendo también, de momento, que en cada experimento la concentración de glucosa permanece prácticamente constante e igual a su valor inicial.

Los resultados calculados para la serie C a partir de los datos primarios se indican en la tabla 6.3.

En la figura 6.2 se representan los valores de y' frente a $1/[G]_0$, de acuerdo con la ecuación [6.9], y en ella se observa que sólo los cuatro primeros experimentos parecen ajustarse a la ecuación citada, desviándose los restantes cada vez más a medida que disminuye $[G]_0$, en el sentido que sería de esperar si la con-

Figura 6.2

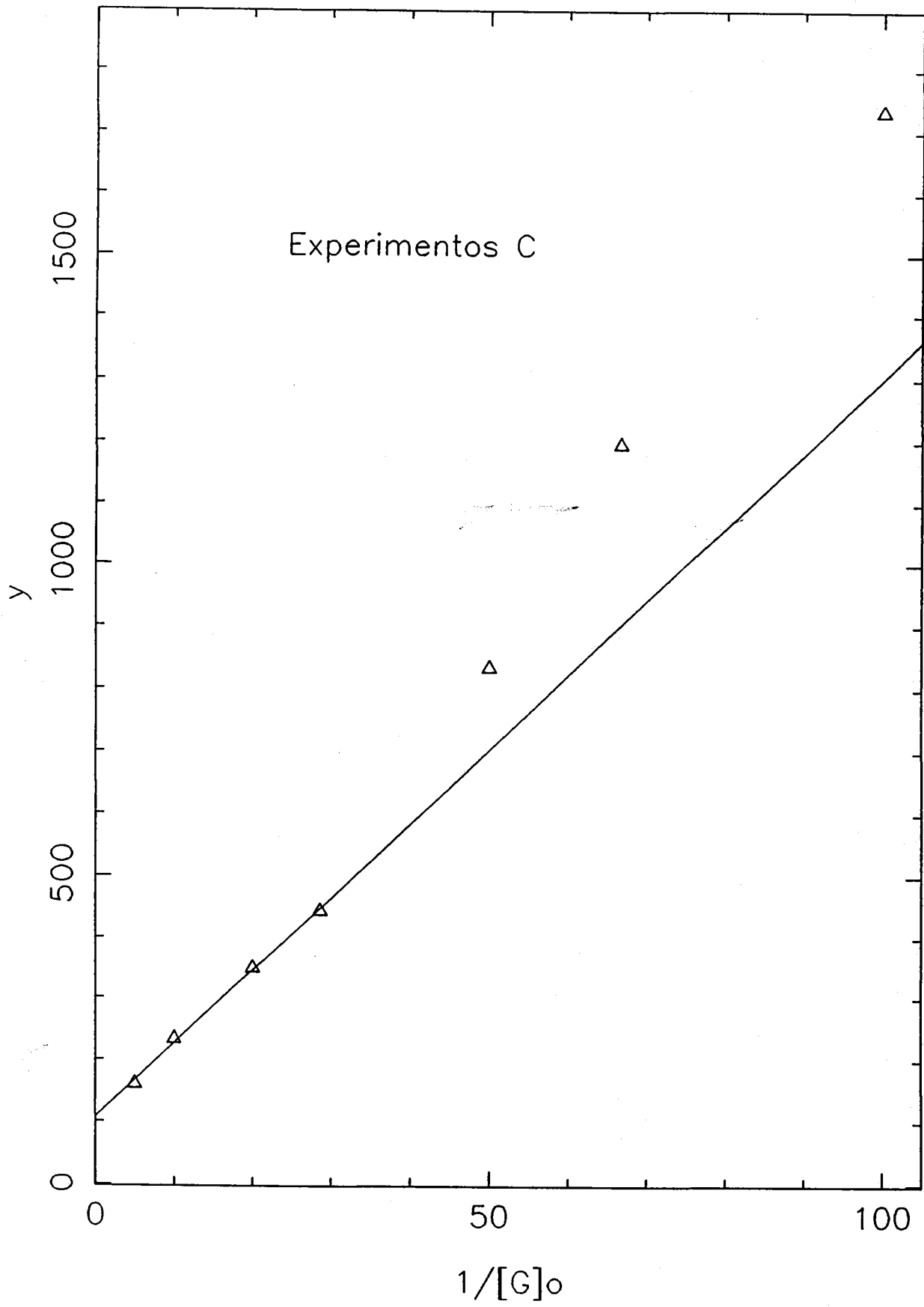


TABLA 6.3

Influencia de la concentración de glucosa

<u>Exp</u>	<u>[G]₀, g/L</u>	<u>c_e</u>	<u>[O₂]_i, M</u>	<u>y</u>	<u>y'</u>
C.1	0,200	0,092	0,000960	869	160
C.2	0,100	0,102	0,000985	856	233
C.3	0,050	0,122	0,001002	861	349
C.4	0,035	0,143	0,001004	880	444
C.5	0,020	0,286	0,001010	1051	834
C.6	0,015	0,439	0,001010	1337	1196
C.7	0,010	0,592	0,001009	1840	1735
C.8	0,005	0,878	0,001029	6035	5965

centración de glucosa en el estado cuasi-estacionario fuera apreciablemente inferior a su valor inicial:

$$[G]_e < [G]_0 \quad [6.10]$$

Este resultado era de esperar para las concentraciones iniciales de glucosa más pequeñas y pone de manifiesto que es necesario abandonar la hipótesis de [G] constante e igual a su valor inicial y determinar $[G]_e$ mediante la ecuación [6.2] del modelo.

Tomando como valor de t_e el tiempo correspondiente a la primera lectura del electrodo que se repite en el estado estacionario, es decir, el segundo dato del estado cuasi-estacionario, y realizando numéricamente la integral que aparece en la ecuación [6.2] se obtienen los valores que se indican en la tabla 6.4.

Se observa en esta tabla que la disminución de la concentración de glucosa supera el 5 % de la glucosa inicial a partir del experimento C.3 y el 20 % en los experimentos C.6 y

TABLA 6.4

Concentración de glucosa en el estado cuasi-estacionario

Exp	t_e , min	$\int_0^{t_e} c \, dt$, min	$[G]_e$, M
C.1	45	9,85	0,1960
C.2	35	9,97	0,0966
C.3	35	11,92	0,0467
C.4	45	16,69	0,0314
C.5	55	26,36	0,0166
C.6	80	46,81	0,0117
C.7	60	42,83	0,0080
C.8	50	45,72	0,0044

C.7, por lo que el efecto de esta variación no puede ser ignorado.

En la figura 6.3 se representan los valores de y' frente a $1/[G]_e$, observándose que en este caso los puntos experimentales se ajustan a la ecuación [6.9], aunque sigue desviándose apreciablemente el experimento C.8; obteniéndose por regresión lineal

$$y' = 69,0 + 13,2 (1/[G]_e) \quad [5.10]$$

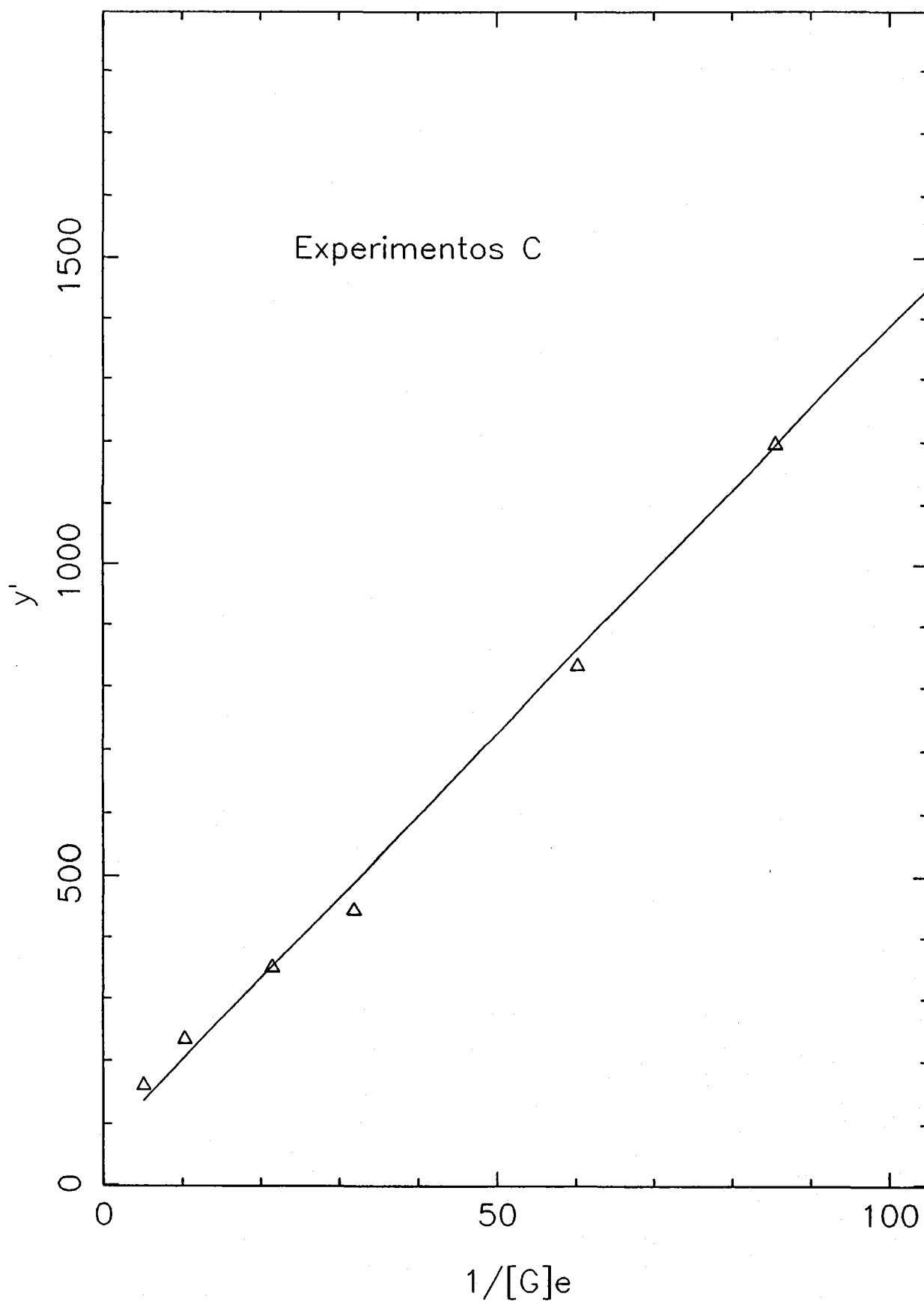
$$r^2 = 0,998$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones [6.9] y [6.10]

$$y = 69,0 + 13,2 (1/[G]_e) + 0,0626 (1/[O_2]_e) \quad [6.11]$$

que comparada con [6.3] conduce a

Figura 6.3



$$r_{\max} = 0,0145 \frac{\text{mol}}{\text{genzima.min}} \quad [6.12]$$

$$K_G = 0,191 \text{ M} \quad [6.13]$$

$$K_{O_2} = 0,000907 \text{ M} \quad [6.14]$$

y teniendo en cuenta que a 25 °C $K_M = 1,694$

$$K_{BG} = 0,120 \text{ M} \quad [6.15]$$

Puede observarse que los valores de K_{BG} y de K_{O_2} obtenidos son del mismo orden, aunque superiores, a los indicados en la tabla 5.1, que han sido calculados a partir de los resultados experimentales encontrados en la Bibliografía. El valor de r_{\max} difiere apreciablemente porque está referido a la concentración de enzima expresada en g/L mientras que los indicados en la tabla 5.1 están referidos a la concentración de grupos FAD activos.

Por otra parte, de acuerdo con estos resultados la velocidad de oxidación de la glucosa en el estado cuasi-estacionario de los experimentos extremos, C.1 y C.8, sería

$$\text{C.1} \quad (-r_G) = \frac{(0,0145)(0,05)}{1 + \frac{0,191}{0,1960} + \frac{0,000907}{0,0000883}} = 5,92 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L.min}}$$

$$\text{C.8} \quad (-r_G) = \frac{(0,0145)(0,05)}{1 + \frac{0,191}{0,0044} + \frac{0,000907}{0,000903}} = 1,60 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L.min}}$$

y por tanto la desviación del equilibrio de mutarrotación, teniendo en cuenta que para 25 °C

$$k_m = 0,0241 \text{ min}^{-1} \quad K_M = 1,694$$

$$(r_{a\beta}) = 0,0241 ([\alpha G] - [\beta G]/1,694) = (-r_a) \quad [6.16]$$

Para los experimentos C.1 y C.8 la concentración de β -glucosa en el estado cuasi-estacionario, admitida la hipótesis del equilibrio de mutarrotación, sería

$$C.1 \quad [\beta G]_{\ddagger} = 0,1232 \text{ M}$$

$$C.8 \quad [\beta G]_{\ddagger} = 0,00277 \text{ M}$$

mientras que aplicando la ecuación [6.16] se obtiene

$$C.1 \quad [\beta G]_e = 0,1217 \text{ M}$$

$$C.8 \quad [\beta G]_e = 0,00235 \text{ M}$$

Estos resultados indican que mientras que la hipótesis del equilibrio de mutarrotación es totalmente válida a concentraciones apreciables de glucosa, para el experimento C.8 la desviación de esta hipótesis es del 15 % lo que justifica en parte sus resultados anómalos en el tratamiento anterior.

6.1.2. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE LA FASE GASEOSA

Para analizar la influencia de la composición de la fase gaseosa se realizó la serie de experimentos D en los que se utilizaron mezclas oxígeno-nitrógeno de diferente composición, en el intervalo aire-oxígeno puro.

Dado que el caudal de oxígeno transportado por la fase gaseosa era considerablemente superior al caudal máximo de oxígeno absorbido:

$$Q_{O_2} = y_{O_2} (25) \left[\frac{700/760}{(0,082)(298)} \right] \frac{1}{60} = 1,57 \cdot 10^{-2} y_{O_2} \frac{\text{mol}}{\text{min}} \quad [6.17]$$

$$\begin{aligned} (N_{O_2} \cdot A)_{\text{maximo}} &= k_L \cdot a [O_2]_i V = \\ &= (0,033) y_{O_2} 10^{-3} (0,2) = 6,6 \cdot 10^{-6} y_{O_2} \frac{\text{mol}}{\text{min}} \end{aligned} \quad [6.18]$$

puede admitirse que la composición de la fase gaseosa permanece constante e igual a la mezcla de alimentación.

Para aplicar la ecuación [6.3] a los experimentos D se calcularon a partir de los datos primarios de los mismos los resultados que se indican en la tabla 6.5.

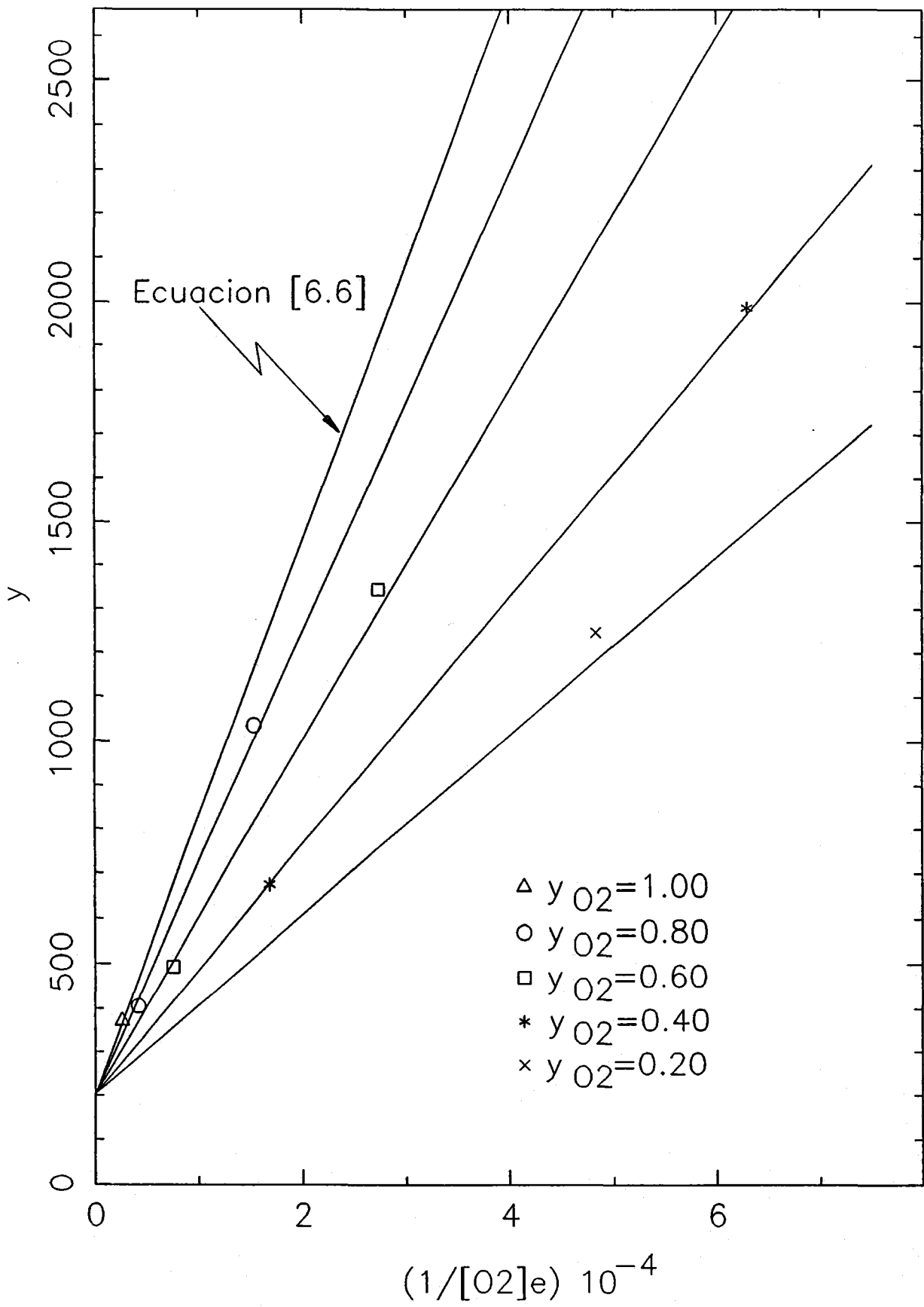
TABLA 6.5

Influencia de la composición de la fase gaseosa

Exp	[GO] ₀ , g/L	y _{O₂}	c _e	[O ₂] _i , M	y	(1/[O ₂] _e) 10 ⁻⁴
D.1	0,0500	0,20	0,021	0,000200	3869	23,810
D.2	0,0500	0,40	0,040	0,000397	1988	6,297
D.3	0,0500	0,60	0,061	0,000600	1345	2,732
D.4	0,0500	0,80	0,082	0,000797	1035	1,530
D.5	0,0150	0,20	0,102	0,000203	1247	4,830
D.6	0,0150	0,40	0,150	0,000396	675	1,684
D.7	0,0150	0,60	0,224	0,000594	493	0,752
D.8	0,0150	0,80	0,300	0,000801	405	0,416
D.9	0,0150	1,00	0,388	0,001001	371	0,257

En la figura 6.4 se representan los valores de y frente a los de [O₂]_e, salvo el punto correspondiente a D.1 por problemas de escalas. Se representa también en esta figura la línea correspondiente a la ecuación [6.6] en la que la fase gaseosa era oxígeno

Figura 6.4



no puro y sobre la que coincide, como era de esperar, el experimento D.6; sin embargo, el resto de los experimentos D se apartan apreciablemente de esta ecuación y tanto más cuanto menor es la fracción molar de oxígeno en la fase gaseosa.

Esta diferencia, muy importante, no puede explicarse por la aproximación de

$$[G]_e \approx [G]_0$$

ya que en estos experimentos la concentración de glucosa es grande comparada con la solubilidad del oxígeno, $[G]_0 = 0,10 \text{ M}$, ni tampoco por la pequeña influencia que pueda tener la resistencia de la fase gaseosa a la transferencia, como se ha visto en la parte 3 de esta memoria.

Aunque sólo se dispone de dos puntos para cada composición de la fase gaseosa, estos parecen ajustarse a líneas rectas con la misma ordenada en el origen de la ecuación [6.6] y menor pendiente, tanto menor cuanto más diluida es la fase gaseosa en oxígeno.

Estos resultados indican que la concentración de oxígeno en la interfase, $[O_2]_i$, influye sobre la pendiente de la ecuación [6.4]

$$y = k_1 + k_2 \{ [O_2]_i \} \frac{1}{[O_2]_e} \quad [6.19]$$

considerando lo que sugiere la figura 6.4 y ajustando los resultados experimentales para que tengan una ordenada en el origen común, se obtienen los valores de $k_2 \{ [O_2]_i \}$ que se indican en la tabla 6.6.

TABLA 6.6

Valores de k_2 $\{[O_2]_i\}$ de la ecuación [6.19]

<u>y_{O_2}</u>	<u>$k_2 \{[O_2]_i\}$</u>
0,20	0,0185
0,40	0,0282
0,60	0,0401
0,80	0,0513
1,00	0,0626

y que se representan en la figura 6.5. Se observa en esta figura que la relación entre k_2 e y_{O_2} parece ser lineal. Al realizar la correspondiente regresión lineal se obtiene

$$k_2 = 0,00675 + 55,65 [O_2]_i \quad [6.20]$$

$$r_2 = 0,999$$

Incluyendo [6.20] en [6.6]

$$y = 204 + 0,00675 \frac{1}{[O_2]_e} + 55,65 \frac{[O_2]_i}{[O_2]_e} \quad [6.21]$$

y [6.21] en [6.11]

$$y = 69,0 + 13,2 \frac{1}{[G]_e} + 0,00675 \frac{1}{[O_2]_e} + 55,65 \frac{[O_2]_i}{[O_2]_e} \quad [6.22]$$

ecuación que considerando $[G]_e \approx [G]_0$ para $[G]_0 \geq 0,10$ M, reproduce los resultados experimentales de las series A, B, C y D con un error relativo medio de

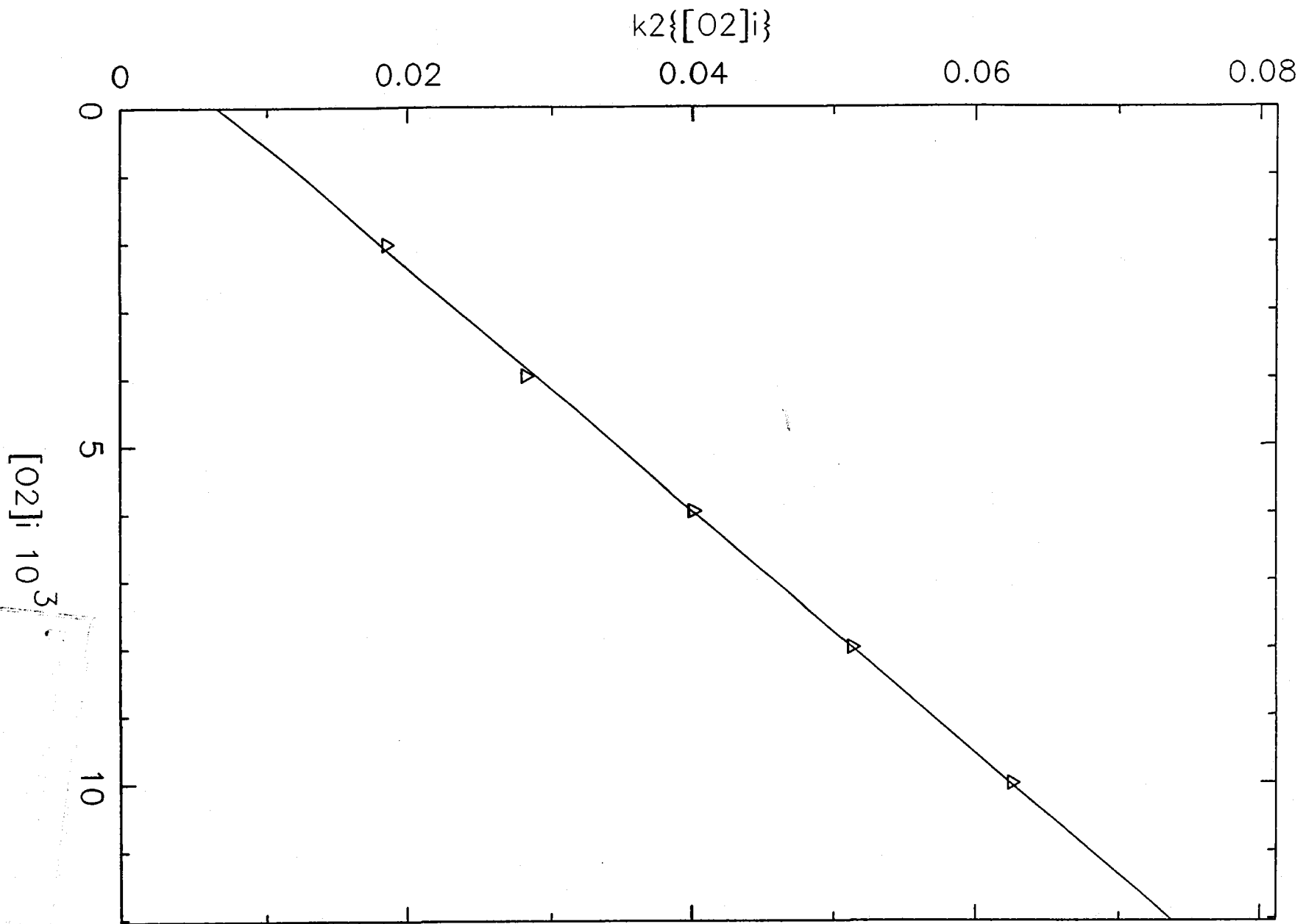


Figura 6.5

$$\frac{\sum [(y_{ca1} - y_{exp})/y_{exp}]^2}{N} = 0,033 ; 3,3 \% \quad [6,23]$$

y máximo del 7 %. Se excluyen los experimentos correspondientes a valores extremadamente pequeños de las concentraciones de los reactivos, C.8, D.1 y D.5, en los que el error experimental se incrementa considerablemente puesto que en la ecuación [6.22] intervienen las inversas de estas concentraciones.

6.1.3. APLICACION DEL MODELO CON ABSORCION DIRECTA EN LA INTERFASE

La forma de la ecuación [6.22] sugiere la aplicabilidad del modelo con absorción directa en la interfase, si el flujo de oxígeno debido al mecanismo directo se expresa como

$$N_{d.a} = k_i . a [E_r] \quad [6.24]$$

$$k_i . a = k_i' . a [O_2]_i [\beta G] \quad [6.25]$$

y considerando el mecanismo representado por las ecuaciones [5.22], que de acuerdo con los resultados indicados en la tabla 5.2 ($k = r_{max}/k_d$ es próximo a la unidad) es una aproximación aceptable.

En estas condiciones el balance de oxígeno, aplicado al estado cuasi-estacionario, queda en la forma

$$\begin{aligned} k_L . a ([O_2]_i - [O_2]_e) &= \\ &= \frac{(1/2) r_{max} [G]_e}{1 + \frac{K_G}{[G]_e} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]_e} + \frac{k_i' . a K_{\beta G}}{k_c} \frac{[O_2]_i}{[O_2]_e}} \end{aligned} \quad [6.26]$$

que puede reordenarse:

$$\frac{[GO]}{2 k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e)} \quad [6.27]$$

$$\frac{1}{r_{max}} + \frac{K_G}{r_{max}} \frac{1}{[G]_e} + \frac{K_{O_2}}{r_{max}} \frac{1}{[O_2]_e} + \frac{k_i \cdot a K_{\beta G}}{k_c r_{max}} \frac{[O_2]_i}{[O_2]_e}$$

expresión que coincide con la ecuación [6.22].

Puesto que este modelo no permite estimar el valor de $[G]_e$ con facilidad y dado que los cálculos indicados al analizar la influencia de la concentración de glucosa han puesto de manifiesto que la hipótesis de que el equilibrio de mutarrotación está establecido en cada instante no se cumple para concentraciones bajas de glucosa, se decidió simular los resultados de los experimentos C para determinar los mejores valores de los parámetros cinéticos utilizando las ecuaciones correspondientes a este modelo y mecanismo, tabla 5.3:

$$\frac{d[\alpha G]}{dt} = -k_m ([\alpha G] - [\beta G]/K_M) \quad [6.28]$$

$$\frac{d[\beta G]}{dt} = k_m ([\alpha G] - [\beta G]/K_M) - \quad [6.29]$$

$$- \frac{r_{max} [GO] \left[1 + \frac{k_i \cdot a}{k_c} \frac{[O_2]_i}{[O_2]} \frac{[\beta G]}{[O_2]} \right]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a K_{\beta G}}{k_c} \frac{[O_2]_i}{[O_2]}}$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) - \quad [6.30]$$

$$- \frac{(1/2) r_{max} [GO]}{1 + \frac{K_{\beta G}}{[\beta G]} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]} + \frac{k_i \cdot a K_{\beta G}}{k_c} \frac{[O_2]_i}{[O_2]}}$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c) \quad [6.31]$$

$$t=0 \quad [\alpha G] = \frac{[G]_0}{1 + K_M} ; [\beta G] = \frac{K_M [G]_0}{1 + K_M} ; [O_2] = [O_2]_i ; c=1 \quad [6.32]$$

Para esta simulación se puso el sistema anterior en forma adimensional y se preparó un programa en Pascal basado en el algoritmo de Runge-Kutta de 4º orden. Este tratamiento y el programa utilizado se describen en el Anexo II de esta Memoria.

Para los valores de los parámetros cinéticos de mutarrotación, k_m y K_M , se utilizaron las ecuaciones [5.2] y [5.3].

Teniendo en cuenta [6.22] que debe ser correcta en cuanto a la influencia de la concentración de oxígeno

$$\frac{K_{O_2}}{r_{max}} = 0,00675 \quad \frac{k_{i.a} K_{\beta G}}{k_c r_{max}} = 55,65$$

por tanto:

$$K_{O_2} = 0,00675 r_{max}$$

$$\frac{k_{i.a}}{k_c} = \frac{55,65 r_{max}}{K_{\beta G}}$$

Para $k_{L.a}$ se utilizaron los valores determinados en la parte 3 de esta Memoria y para k_{e1} el valor indicado por el fabricante del electrodo de oxígeno

$$k_{e1} = \frac{1}{10} \text{ s}^{-1} = 6 \text{ min}^{-1}$$

aunque también se ensayaron los valores de 3 y 12 min^{-1} correspondientes a unas constantes de tiempo de 20 y 5 segundos, respecti-

vamente.

Mediante este procedimiento sólo era necesario tantear con los valores de r_{\max} y K_{BG} que están afectados por la influencia real de la concentración de β -glucosa.

Los valores finales que minimizan la variación de r_{\max} para los experimentos de esta serie, excluido el experimento C.8 por las razones ya indicadas, son:

$$K_{BG} = 0,0740 \text{ M} ; \quad K_{O_2} = 0,0000675 \text{ M} \quad [6.33]$$

y
$$\frac{k_i \cdot a}{k_c} = 7,65 \text{ M}^{-1}$$

con los que se obtiene en la simulación los resultados que se indican en las tablas 6.7 a 6.14, para los primeros 80 minutos de cada experimento.

En cada tabla se indica también el error relativo medio en la simulación, SSR. Un resumen de los resultados se indican en la tabla 6.15, el valor medio de r_{\max} para los experimentos C.1 a C.7 resulta

$$r_{\max} = 0,0104 \frac{\text{mol}}{\text{genzima} \cdot \text{min}} \quad [6.34]$$

que es el que se ha utilizado en la simulación del experimento C.8, tabla 6.14.

TABLA 6.7

Experimento C.1

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0099$ $K_{BG} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i.a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,07423	0,12577	1,000	1,000	1,000
5	0,07416	0,12356	0,525	0,538	0,561
10	0,07394	0,12117	0,249	0,255	0,255
15	0,07357	0,11854	0,133	0,135	0,163
20	0,07308	0,11602	0,101	0,102	0,112
25	0,07248	0,11363	0,094	0,094	0,102
30	0,07177	0,11128	0,092	0,092	0,102
35	0,07102	0,10914	0,092	0,092	0,102
40	0,07018	0,10704	0,092	0,092	0,092
45	0,06933	0,10510	0,092	0,092	0,092
50	0,06845	0,10324	0,092	0,092	0,092
55	0,06752	0,10139	0,092	0,092	0,092
60	0,06660	0,09967	0,092	0,092	0,092
70	0,06471	0,09631	0,093	0,093	0,092
80	0,06281	0,09314	0,093	0,093	0,092

SSR = 0,0446

TABLA 6.8

Experimento C.2

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0100$ $K_{B_G} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i \cdot a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[α_G], M</u>	<u>[β_G], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,03712	0,06288	1,000	1,000	1,000
5	0,03707	0,06160	0,615	0,626	0,643
10	0,03695	0,06035	0,350	0,357	0,337
15	0,03675	0,05904	0,196	0,200	0,184
20	0,03650	0,05779	0,133	0,134	0,133
25	0,03619	0,05658	0,111	0,111	0,112
30	0,03582	0,05539	0,104	0,104	0,102
35	0,03544	0,05431	0,103	0,103	0,102
40	0,03501	0,05324	0,102	0,102	0,102
45	0,03457	0,05226	0,102	0,102	0,102
50	0,03412	0,05131	0,103	0,103	0,102
55	0,03364	0,05037	0,103	0,103	0,102
60	0,03318	0,04949	0,104	0,104	0,102
70	0,03221	0,04779	0,104	0,104	0,102
80	0,03124	0,04617	0,105	0,105	0,102

SSR = 0.0223

TABLA 6.9

Experimento C.3

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0106$ $K_{gg} = 0,0740$ $K_{o_2} = 0,0000675$ $k_i.a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,01856	0,03144	1,000	1,000	1,000
5	0,01853	0,03066	0,709	0,718	0,684
10	0,01846	0,02992	0,486	0,493	0,439
15	0,01834	0,02921	0,322	0,327	0,286
20	0,01819	0,02855	0,222	0,224	0,194
25	0,01802	0,02791	0,165	0,167	0,143
30	0,01782	0,02729	0,138	0,138	0,122
35	0,01761	0,02671	0,126	0,127	0,122
40	0,01738	0,02614	0,122	0,122	0,122
45	0,01714	0,02562	0,121	0,121	0,122
50	0,01690	0,02512	0,121	0,121	0,122
55	0,01664	0,02462	0,122	0,122	0,122
60	0,01639	0,02415	0,123	0,123	0,122
65	0,01612	0,02368	0,124	0,124	0,122
70	0,01587	0,02325	0,125	0,125	0,122
80	0,01535	0,02239	0,127	0,127	0,122

SSR = 0,0604

TABLA 6.10

Experimento C.4

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0110$ $K_{BG} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i \cdot a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,01299	0,02201	1,000	1,000	1,000
5	0,01297	0,02140	0,759	0,766	0,745
10	0,01291	0,02085	0,568	0,574	0,582
15	0,01282	0,02031	0,417	0,422	0,429
20	0,01271	0,01982	0,313	0,316	0,316
25	0,01258	0,01936	0,241	0,243	0,235
30	0,01243	0,01891	0,194	0,196	0,194
35	0,01228	0,01849	0,169	0,170	0,163
40	0,01210	0,01808	0,155	0,155	0,143
45	0,01193	0,01770	0,149	0,149	0,143
50	0,01175	0,01734	0,146	0,146	0,143
55	0,01156	0,01698	0,146	0,146	0,143
60	0,01138	0,01664	0,146	0,146	0,143
70	0,01100	0,01598	0,150	0,149	0,143
80	0,01062	0,01537	0,154	0,154	0,143

SSR = 0,0327

TABLA 6.11

Experimento C.5

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0109$ $K_{\beta G} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i \cdot a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,00742	0,01258	1,000	1,000	1,000
5	0,00741	0,01220	0,840	0,845	0,776
10	0,00738	0,01186	0,711	0,715	0,684
15	0,00732	0,01154	0,603	0,606	0,592
20	0,00725	0,01124	0,521	0,523	0,500
25	0,00718	0,01097	0,456	0,458	0,439
30	0,00708	0,01070	0,404	0,406	0,439
35	0,00699	0,01046	0,367	0,368	0,347
40	0,00689	0,01022	0,338	0,339	0,316
45	0,00678	0,01000	0,318	0,318	0,296
50	0,00668	0,00979	0,304	0,304	0,286
55	0,00657	0,00958	0,294	0,294	0,286
60	0,00646	0,00938	0,288	0,289	0,286
70	0,00624	0,00900	0,285	0,285	0,286
80	0,00601	0,00864	0,288	0,288	0,286

SSR = 0,0461

TABLA 6.12

Experimento C.6

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0100$ $K_{BG} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i \cdot a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[aG], M</u>	<u>[BG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,00557	0,00943	1,000	1,000	1,000
5	0,00556	0,00917	0,883	0,887	0,878
10	0,00553	0,00892	0,787	0,790	0,816
15	0,00549	0,00869	0,706	0,709	0,755
20	0,00545	0,00848	0,644	0,646	0,704
25	0,00539	0,00829	0,593	0,595	0,653
30	0,00533	0,00809	0,552	0,553	0,602
35	0,00526	0,00792	0,520	0,521	0,551
40	0,00518	0,00775	0,495	0,496	0,520
45	0,00511	0,00759	0,476	0,477	0,490
50	0,00504	0,00744	0,462	0,463	0,469
55	0,00496	0,00729	0,452	0,452	0,459
60	0,00488	0,00715	0,445	0,445	0,449
65	0,00480	0,00701	0,441	0,441	0,449
70	0,00472	0,00687	0,439	0,439	0,439
80	0,00456	0,00661	0,439	0,439	0,439

SSR = 0,0362

TABLA 6.13

Experimento C.7

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0101$ $K_{\beta G} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i \cdot a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,00371	0,00629	1,000	1,000	1,000
5	0,00371	0,00610	0,917	0,919	0,898
10	0,00369	0,00593	0,848	0,851	0,847
15	0,00366	0,00577	0,791	0,792	0,796
20	0,00363	0,00563	0,746	0,747	0,755
25	0,00359	0,00550	0,709	0,710	0,714
30	0,00354	0,00537	0,679	0,680	0,684
35	0,00350	0,00525	0,656	0,656	0,653
40	0,00345	0,00513	0,637	0,638	0,633
45	0,00340	0,00502	0,623	0,624	0,612
50	0,00334	0,00492	0,613	0,613	0,602
55	0,00329	0,00481	0,605	0,605	0,592
60	0,00324	0,00472	0,600	0,600	0,592
70	0,00313	0,00453	0,595	0,595	0,592
80	0,00302	0,00436	0,595	0,595	0,592

SSR = 0,0108

TABLA 6.14

Experimento C.8

PARAMETROS CINETICOS

$r_{max} = 0,0104$ $K_{BG} = 0,0740$ $K_{O_2} = 0,0000675$ $k_i.a/k_c = 7,6500$

<u>t, min</u>	<u>[αG], M</u>	<u>[βG], M</u>	<u>Oxígeno</u>	<u>Lect-Calc</u>	<u>Lect-Exp</u>
0	0,00186	0,00314	1,000	1,000	1,000
5	0,00185	0,00305	0,955	0,956	0,980
10	0,00184	0,00295	0,918	0,919	0,949
15	0,00183	0,00287	0,887	0,888	0,918
20	0,00181	0,00279	0,863	0,864	0,908
25	0,00179	0,00272	0,843	0,844	0,898
30	0,00177	0,00265	0,827	0,828	0,898
35	0,00174	0,00259	0,815	0,815	0,888
40	0,00171	0,00253	0,805	0,805	0,888
45	0,00169	0,00247	0,798	0,798	0,878
50	0,00166	0,00242	0,792	0,792	0,878
55	0,00163	0,00236	0,788	0,788	0,878
60	0,00160	0,00231	0,786	0,786	0,878

SSR = 0,0704

TABLA 6.15

<u>Exp</u>	<u>Γ_{max}</u>	<u>Error, %</u>
C.1	0,0099	4,46
C.2	0,0100	2,23
C.3	0,0106	6,04
C.4	0,0110	3,27
C.5	0,0109	4,61
C.6	0,0100	3,62
C.7	0,0101	1,08

6.1.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El estudio de la influencia de la temperatura se realizó en la serie de experimentos E, cuatro experimentos para cada una de las temperaturas, 30, 35, 40, 45 y 50 °C. En estos experimentos se modificó la concentración de glucosa-oxidasa en presencia de catalasa, para los valores 0,0500, 0,0250 y 0,0125 g/L; en cada temperatura se realizó también un experimento con 0,0250 g/L de glucosa-oxidasa en ausencia de catalasa y añadiendo KCN en concentración 1 mM, para estar seguros de la inhibición completa de la descomposición del peróxido de hidrógeno.

Como se observa en los resultados indicados en la parte 4 de esta Memoria, los experimentos con 0,0250 g/L de glucosa-oxidasa y 1 mM de KCN coinciden prácticamente con los de 0,0500 g/L de glucosa-oxidasa y 0,075 g/L de catalasa, lo que indica que siguen manteniéndose las ecuaciones estequiométricas ya establecidas para la reacción en presencia y ausencia de catalasa.

Dado que en el análisis de la influencia de la temperatura sólo se ha variado la concentración de glucosa-oxidasa y que en

todos los casos la concentración inicial de glucosa fue 0,1 M, de acuerdo con los resultados ya establecidos a 25 °C deberá ser aplicable la ecuación [6.4]

$$y = k_1 + k_2 (1/[O_2]_i)$$

que para la temperatura indicada resultó ser

$$y = 204 + 0,0626 (1/[O_2]_i)$$

Con objeto de comprobar esta hipótesis se calcularon para estos experimentos los resultados indicados en la tabla 6.16.

Estos resultados se representan en la forma que sugiere la ecuación [6.4] en la figura 6.6.

Se observa en esta figura que los resultados se desvían considerablemente de la ecuación [6.4], sobre todo en los puntos correspondientes a la menor concentración de glucosa-oxidasa y tanto más cuanto mayor es la temperatura. Este resultado parece indicar que se produce desnaturalización térmica de la enzima, de la glucosa-oxidasa no de la catalasa, ya que el comentario indicado anteriormente de resultados prácticamente iguales entre el 1º y el 2º experimento de cada temperatura se mantiene en todo el intervalo investigado.

Con objeto de comprobar esta hipótesis se realizaron los experimentos de desnaturalización térmica indicados en la tabla 4.47, que se representan en la figura 6.7.

Estos resultados indican que a este nivel de temperatura se produce una desnaturalización térmica apreciable que parece ajustarse a una cinética de orden cero ya que los puntos experimentales de cada una de las cuatro temperaturas se alinean bien en

TABLA 6.16

Influencia de la temperatura

<u>Exp</u>	<u>T, °C</u>	<u>[O₂]_i, M</u>	<u>k_L.a, min⁻¹</u>	<u>c_e</u>	<u>y</u>	<u>1/[O₂]_e 10⁻⁴</u>
E.1	30	0,000911	0,042	0,133	754	0,8256
E.3	30	0,000911	0,042	0,265	445	0,4144
E.4	30	0,000911	0,042	0,582	391	0,1887
E.5	35	0,000835	0,047	0,163	761	0,7343
E.7	35	0,000835	0,047	0,357	495	0,3353
E.8	35	0,000835	0,047	0,694	520	0,1725
E.9	40	0,000777	0,052	0,204	778	0,6311
E.11	40	0,000777	0,052	0,408	523	0,3156
E.12	40	0,000777	0,052	0,806	798	0,1597
E.13	45	0,000721	0,058	0,255	802	0,5437
E.15	45	0,000721	0,058	0,510	610	0,2718
E.16	45	0,000721	0,058	0,786	698	0,1764
E.17	50	0,000669	0,065	0,336	866	0,4447
E.19	50	0,000669	0,065	0,592	704	0,2524
E.20	50	0,000669	0,065	0,786	671	0,1901

rectas al representar la actividad relativa frente al tiempo, si bien estas rectas no tienen una ordenada en el origen uno probablemente debido a la dificultad de establecer con precisión el tiempo cero, que aumenta al hacerlo la temperatura de trabajo.

Por regresión lineal de estos resultados se obtienen los valores de la constante cinética de orden cero que se indican en la tabla 6.17, y que se representan en la figura 6.8 de la forma que sugiere la ecuación de Arrhenius, obteniéndose la siguiente expresión en función de la temperatura absoluta

Figura 6.6

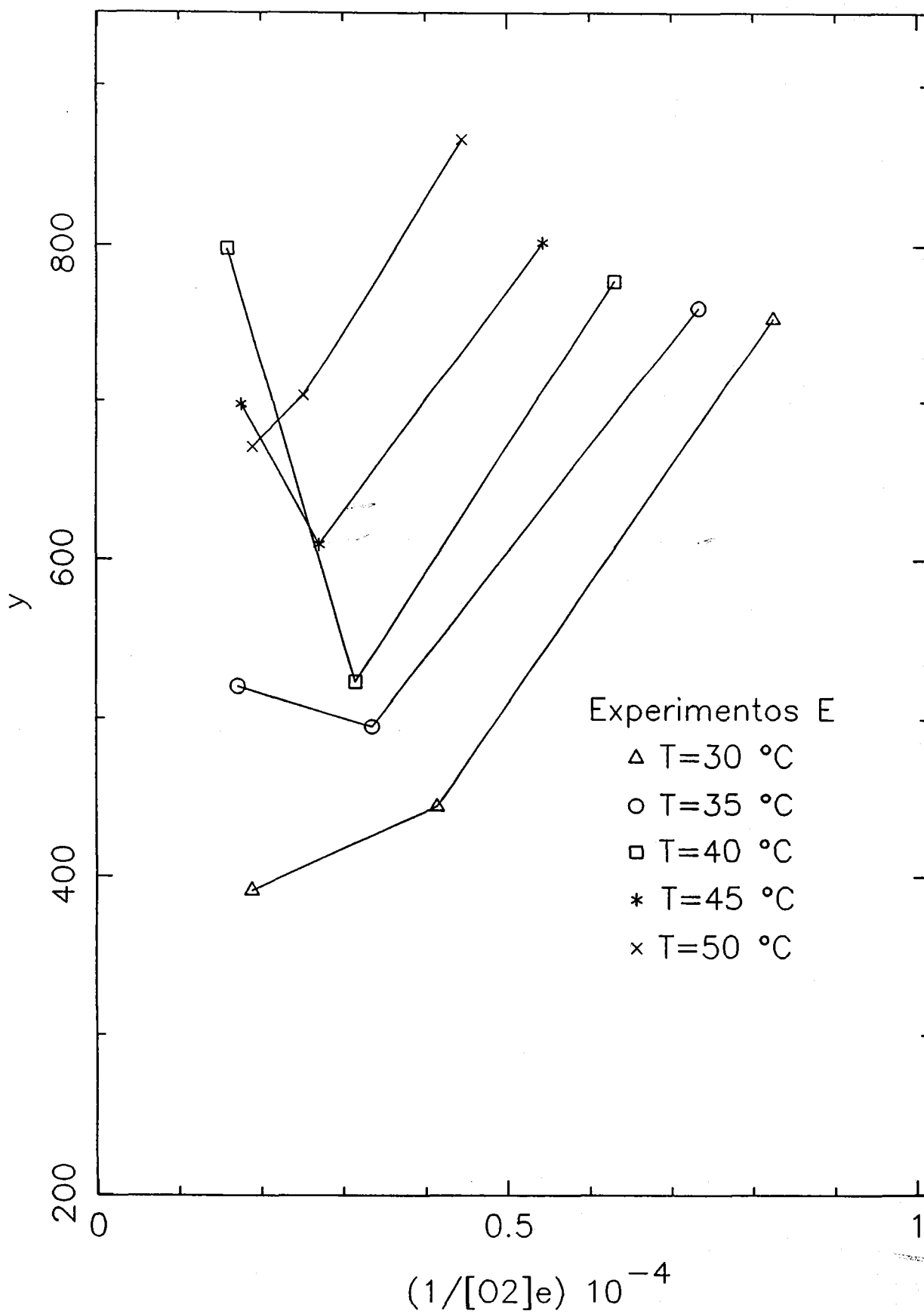


Figura 6.7

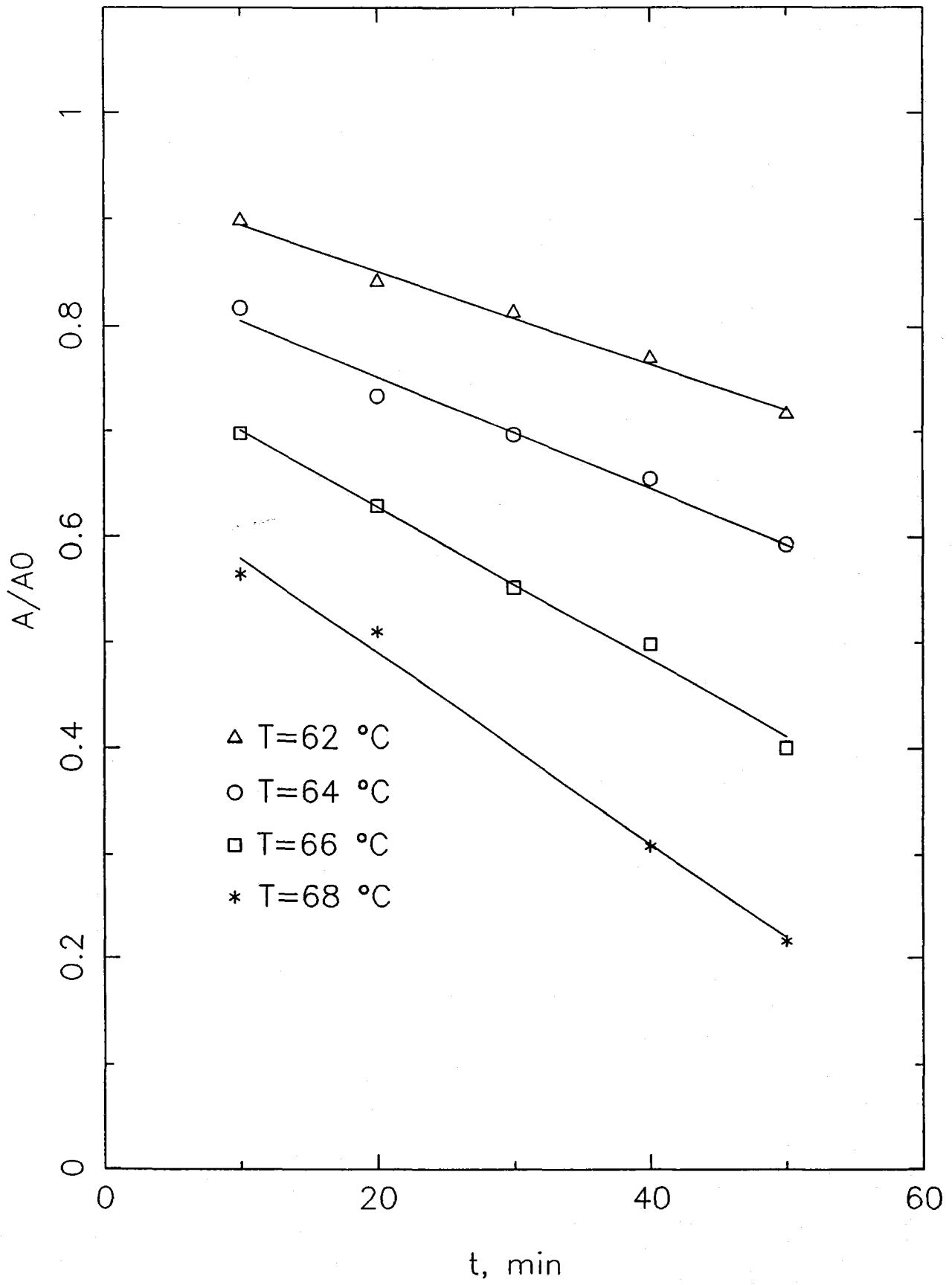
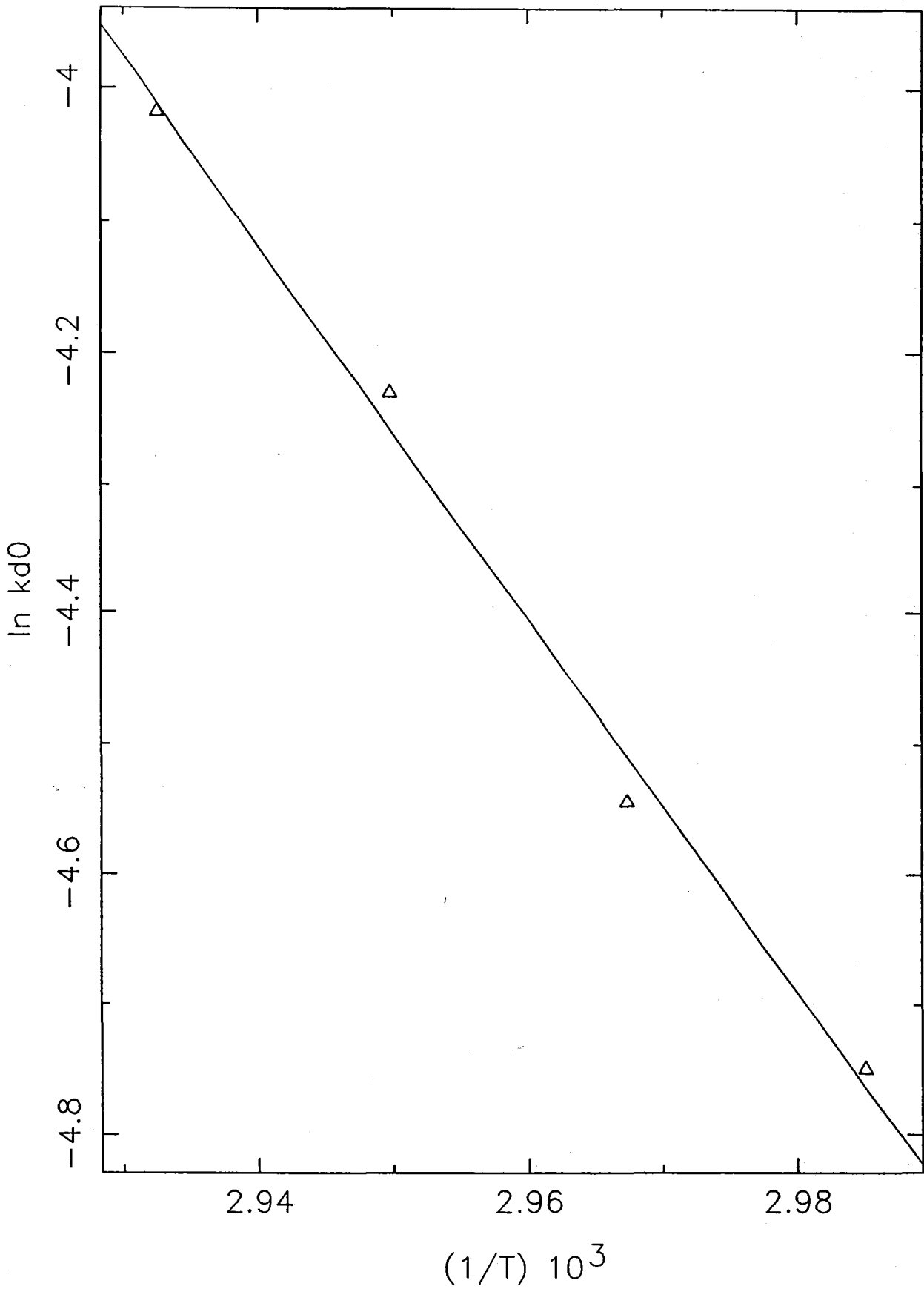


Figura 6.8



$$k_{d0} = 3,18 \cdot 10^{16} \exp[-118980/(R.T)], \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{min}) \quad [6.35]$$

$$r^2 = 0,993$$

con R expresado en J/mol

TABLA 6.17

Valores de k_{d0}

<u>T, °C</u>	<u>k_{d0}, g/(L.min)</u>	<u>r^2</u>
62	0,00866	0,990
64	0,01063	0,989
66	0,01454	0,993
68	0,01800	0,992

Este resultado difiere apreciablemente del obtenido por Malikkides y Weiland (1982), que estudian también la desnaturalización térmica de la glucosa-oxidasa a pH = 5,5 y en el intervalo de 61 a 69 °C. Los resultados de estos autores se ajustan a una cinética de primer orden con una constante cinética dada por:

$$k_{d1} = 2,547 \cdot 10^{50} \exp[-333545/(R.T)], \text{ min}^{-1} \quad [6.36]$$

con una energía de activación aparente anormalmente alta para un proceso de este tipo.

La ecuación [6.35] permite explicar los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la temperatura ya que al ser la desnaturalización de orden cero su influencia se hará más importante cuanto menor sea la concentración inicial de glucosa-oxidasa como se observa cualitativamente en la figura 6.6 y además los valores de k_{d0} obtenidos mediante la ecuación [6.35]

para las temperaturas estudiadas que se indican en la tabla 6.18,

TABLA 6.18
Valores de k_{do}

<u>T, °C</u>	<u>k_{do}, g/(L.min)</u>
25	0,000042
30	0,000093
35	0,000201
40	0,000423
45	0,000868
50	0,001744

permiten comprobar que para un tiempo de 30 minutos, que es lo que aproximadamente se tarda en alcanzar el estado estacionario a la temperatura de 40 °C, la glucosa-oxidasa desnaturizada sería:

$$[GO]_{\text{desnaturizada}} = 0,000423 \cdot 30 = 0,01269 \quad [6.37]$$

es decir, que en el último experimento de esta temperatura se habría desnaturizado toda la enzima inicialmente puesta. Por el contrario la ecuación de Malikkides y Weiland indica que a 50 °C sólo se pierde un 3 % de actividad en 2 horas.

Por esta razón se recalcularon los valores de y , en la forma que indica la expresión siguiente

$$y' = \frac{[GO] - k_{do} t_e}{2 k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e)} \quad [6.38]$$

para tener en cuenta la desnaturización térmica de la glucosa-

oxidasa. Los resultados se indican en la tabla 6.19.

TABLA 6.19

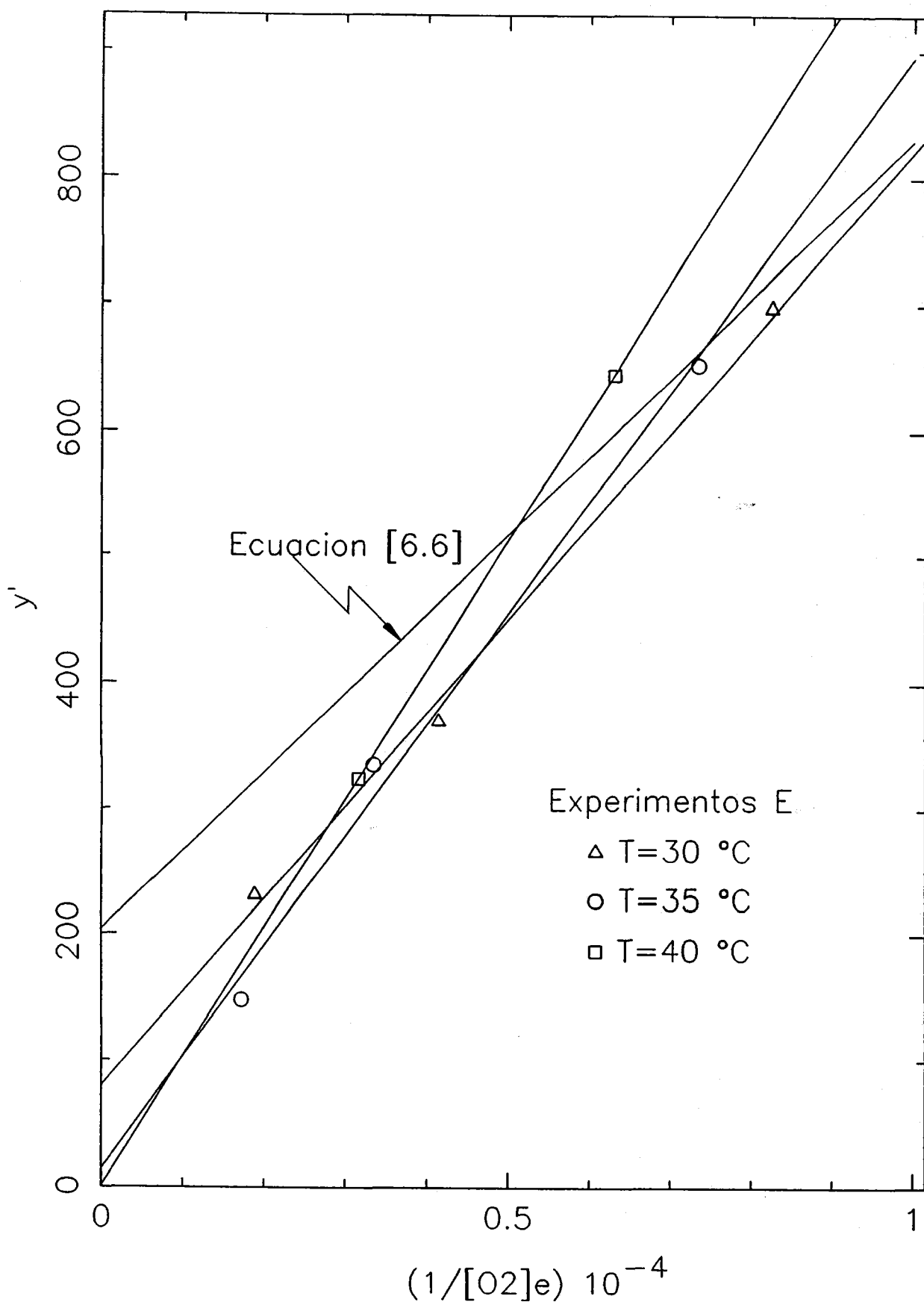
<u>Exp</u>	<u>C_e</u>	<u>y</u>	<u>1/[O₂]_e 10⁻⁴</u>
E.1	40	698	0,8256
E.3	45	370	0,4144
E.4	55	231	0,1887
E.5	35	654	0,7343
E.7	40	335	0,3353
E.8	45	148	0,1725
E.9	20	646	0,6311
E.11	20-25	324	0,3156
E.12	40	-	0,1597

No se indica en esta tabla los resultados correspondientes a 45 y 50 °C por que salvo el primer experimento de estas temperaturas, en los restantes la glucosa-oxidasa se ha desnaturizado por completo en el momento de alcanzar el estado estacionario como sugieren los propios resultados primarios indicados en la parte 4 de esta Memoria.

En la figura 6.9 se representan los valores de y' frente a $1/[O_2]_e$ de acuerdo con la ecuación [6.4], también se indica en esta figura, como referencia, la línea correspondiente a 25 °C, ecuación [6.6] (a esta temperatura, 25 °C, la desnaturización de la glucosa-oxidasa era inferior al 10 % en todos los experimentos).

Los valores de y' en esta figura parecen ajustarse a la ecuación [6.4], obteniéndose los siguientes resultados

Figura 6.9



$$T = 30 \text{ } ^\circ\text{C} \quad y' = 80,1 + 0,0741 (1/[\text{O}_2]_e)$$

$$r^2 = 0,996$$

$$T = 35 \text{ } ^\circ\text{C} \quad y' = 14,0 + 0,0882 (1/[\text{O}_2]_e)$$

$$r^2 = 0,992$$

$$T = 40 \text{ } ^\circ\text{C} \quad y' = 1,90 + 0,1021 (1/[\text{O}_2]_e)$$

Resumiéndose los valores de k_1 y k_2 en función de la temperatura en la tabla 6.20.

TABLA 6.20

<u>T, °C</u>	<u>$k_1, \frac{\text{Genzima.min}}{\text{mol}}$</u>	<u>$k_2, \frac{\text{Genzima.min}}{\text{L}}$</u>
25	204	0,0626
30	80,1	0,0741
35	14,0	0,0882
40	1,90	0,1021

Aunque de acuerdo con la ecuación [6.22] estos parámetros cinéticos vienen dados por

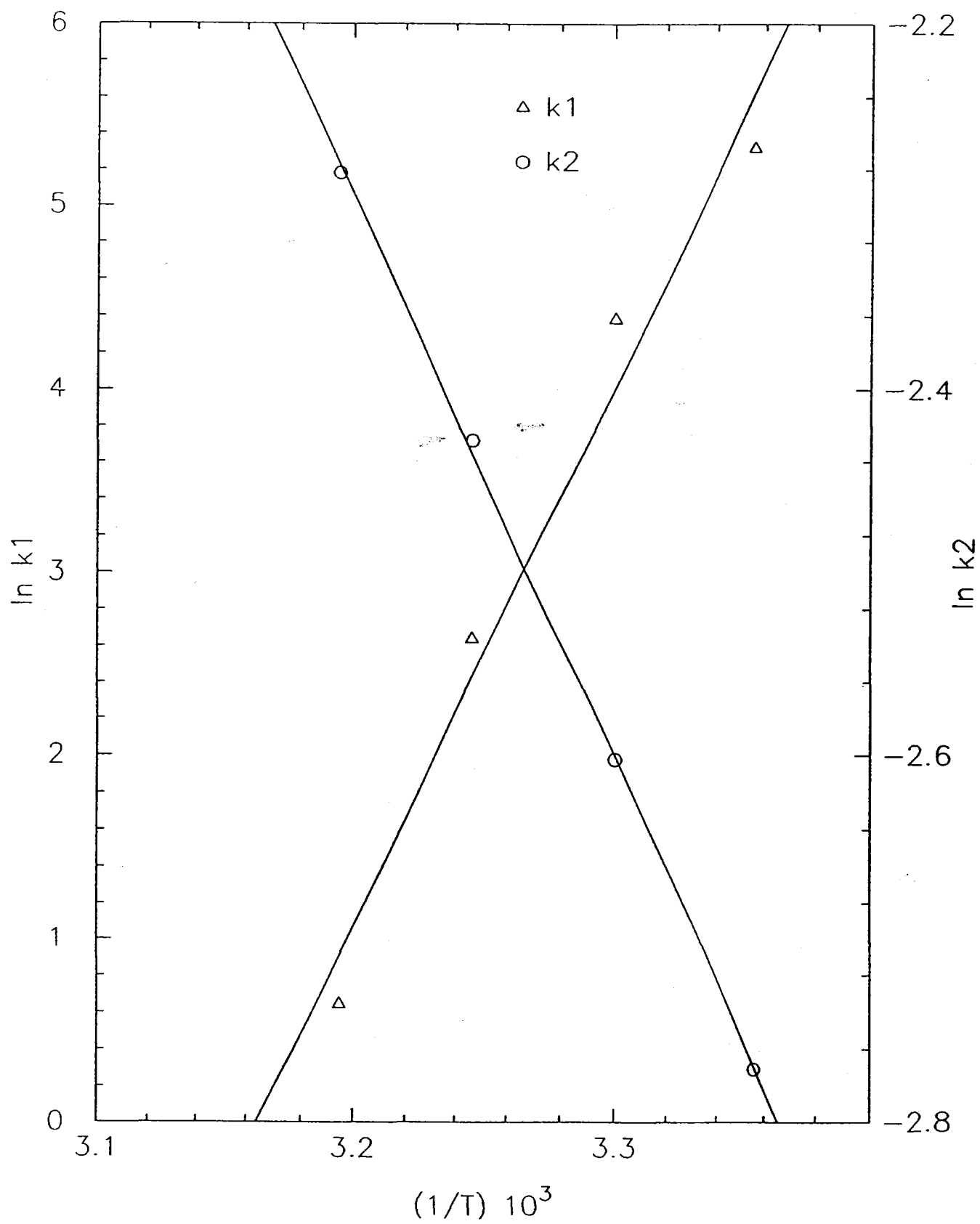
$$k_1 = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_G}{r_{\max}} \frac{1}{0,10} \quad [6.39]$$

$$k_2 = \frac{K_{O_2}}{r_{\max}} + \frac{k_i \cdot a \cdot K_{B_G}}{K_c \cdot r_{\max}} [\text{O}_2]_i \quad [6.40]$$

y es posible que no se ajusten a la ecuación de Arrhenius, se han representado en la forma que sugiere esta última en la figura 6.10.

En esta se observa que si bien los valores de k_2 parecen

Figura 6.10



ajustarse bien a la ecuación de Arrhenius, no ocurre así con los de k_1 , que no es de extrañar dado que estos parámetros son combinaciones por sumas de constantes cinéticas y concentraciones de reactivos que permanecen prácticamente constantes a cada temperatura.

Las ecuaciones obtenidas en función de la temperatura absoluta mediante la ecuación de Arrhenius son las siguientes

$$k_1 = 4,63 \cdot 10^{-41} \exp(29354/T), (\text{genzima.min})/\text{mol}$$

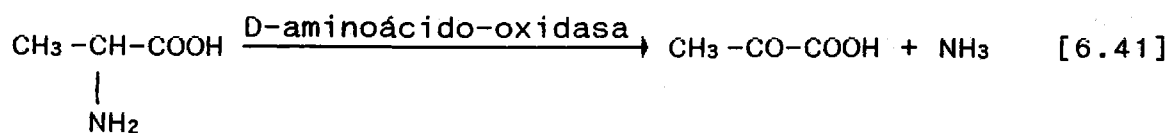
$$r^2 = 0,972$$

$$k_2 = 1827 \exp(-3064/T), (\text{genzima.min})/L$$

$$r^2 = 0,999$$

6.2. OXIDACION DE ALANINA CON OXIGENO MOLECULAR EN PRESENCIA DE D-AMINOACIDO-OXIDASA

Los experimentos realizados con este sistema, serie F, tenían la finalidad de comprobar que la velocidad de la reacción enzimática que tiene lugar:



permite su aplicación para el estudio de la transferencia de oxígeno en sistemas biológicos.

Por esta razón, únicamente se ha investigado la influencia de las concentraciones de enzima y de sustrato en las condiciones óptimas para la actuación de la enzima.

T = 39 °C

pH = 7,3

con la misma concentración de catalasa determinada en el sistema anterior, grado de agitación de la fase líquida constante y oxígeno puro saturado con respecto de la fase líquida como fase gaseosa.

Los experimentos de absorción física de oxígeno en las mismas condiciones fluidodinámicas, comentadas en la parte 3 de esta Memoria, han permitido determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en las condiciones de operación:

$$k_L \cdot a = 0,128 \text{ min}^{-1}$$

y a partir de los datos primarios de los experimentos realizados con este sistema se obtienen los resultados que se indican en la tabla 6.21, para el estado estacionario.

TABLA 6.21

Resultados de los experimentos de la serie F

<u>Exp</u>	<u>[ALA], M</u>	<u>[A0], g/L</u>	<u>[O₂]_i, M</u>	<u>C_e</u>
F.1	0,100	0,250	0,000875	0,816
F.2	0,100	0,500	0,000875	0,643
F.3	0,100	1,000	0,000875	0,330
F.4	0,100	1,500	0,000875	0,153
F.5	0,200	1,000	0,000856	0,210
F.6	0,050	1,000	0,000884	0,560

Puesto que el mecanismo de actuación de la D-aminoácido-oxidasa es semejante al de la glucosa-oxidasa se utilizó para

interpretar estos resultados la ecuación:

$$k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e) = \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [AO]}{1 + K_{ALA}/[ALA] + K_{O_2}/[O_2]_e} \quad [6.42]$$

que puede reordenarse en la forma:

$$\frac{[AO]}{2 k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e)} = \frac{1}{r_{\max}} + \frac{K_{ALA}}{r_{\max}} \frac{1}{[ALA]} + \frac{K_{O_2}}{r_{\max}} \frac{1}{[O_2]_e} \quad [6.43]$$

Los datos primarios de estos experimentos indican que en las condiciones utilizadas la velocidad de reacción es algo inferior a la del sistema anterior, por lo que la variación de la concentración de sustrato al alcanzarse el estado estacionario será despreciable en todos los casos y para los experimentos F.1 a F.4 la ecuación [6.43] puede expresarse en la forma:

$$y = \frac{[AO]}{2 k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]_e)} = k_1 + k_2 \frac{1}{[O_2]_e} \quad [6.44]$$

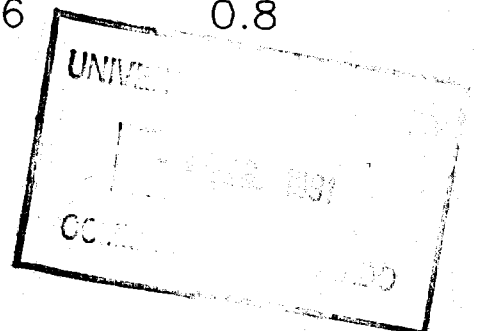
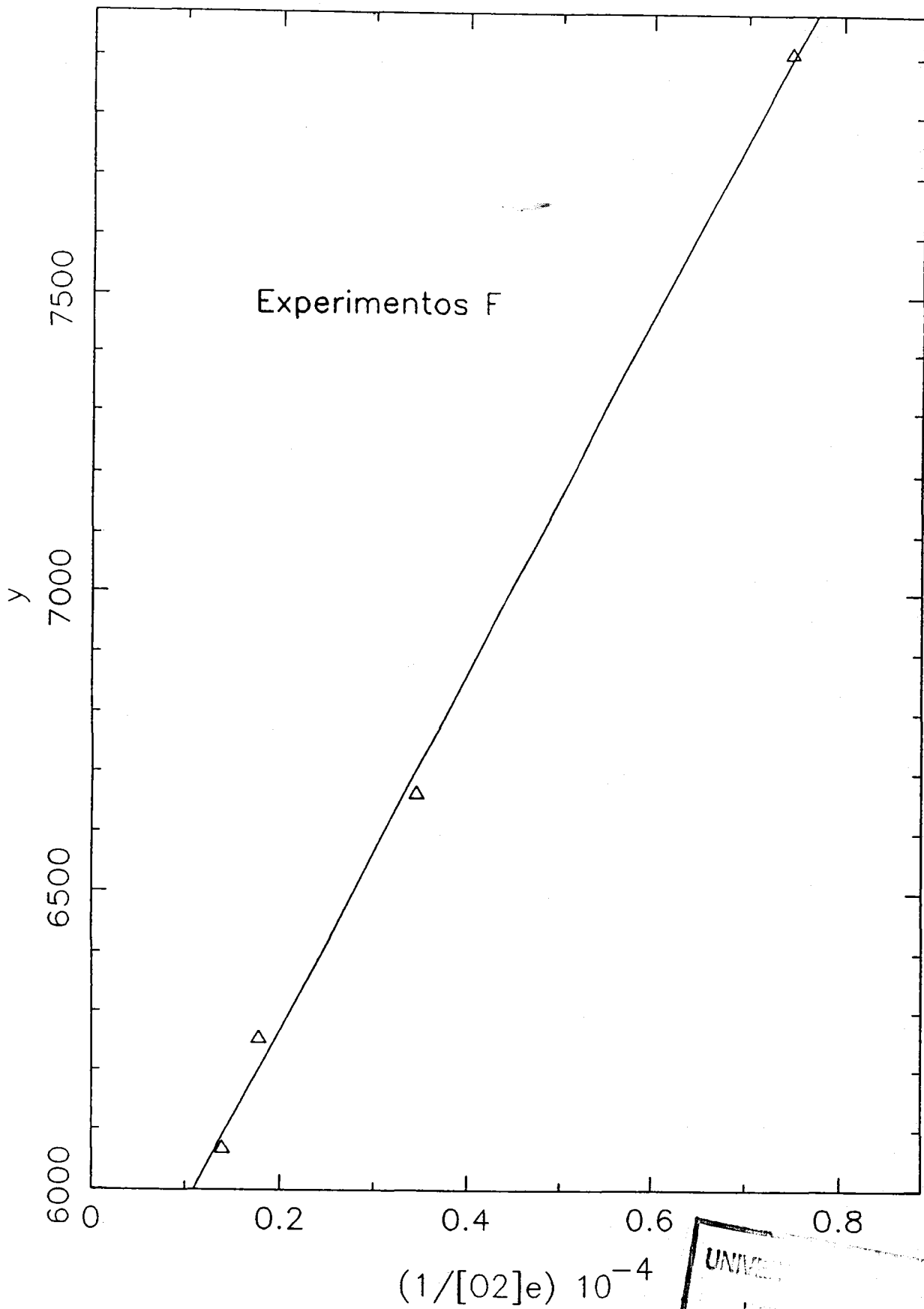
siendo

$$k_1 = \frac{1}{r_{\max}} \left[1 + \frac{K_{ALA}}{0,10} \right] ; \quad k_2 = \frac{K_{O_2}}{r_{\max}} \quad [6.45]$$

Para comprobar la ecuación [6.44] se han calculado los valores indicados en la tabla 6.22, que se representan en la figura 6.11, en la que se observa que se ajustan bien a [6.44] y por regresión lineal de los mismos se obtiene:

$$y = 5672 + 0,298 (1/[O_2]_e) \quad [6.46]$$

Figura 6.11



$$r^2 = 0,998$$

TABLA 6.22

<u>Exp</u>	<u>y, (genzima.min)/mol</u>	<u>1/[O₂]_e, M⁻¹</u>
F.1	6066	1401
F.2	6253	1777
F.3	6663	3463
F.4	7906	7470

Mediante [6.46] pueden interpretarse los experimentos F.3, F.5 y F.6, reordenando [6.43] en la forma:

$$y - 0,298 \frac{1}{[O_2]_e} = \frac{1}{r_{max}} + \frac{K_{ALA}}{r_{max}} \frac{1}{[ALA]} \quad [6.47]$$

para lo que se calculan los resultados indicados en la tabla 6.23, que se representan en la figura 6.12.

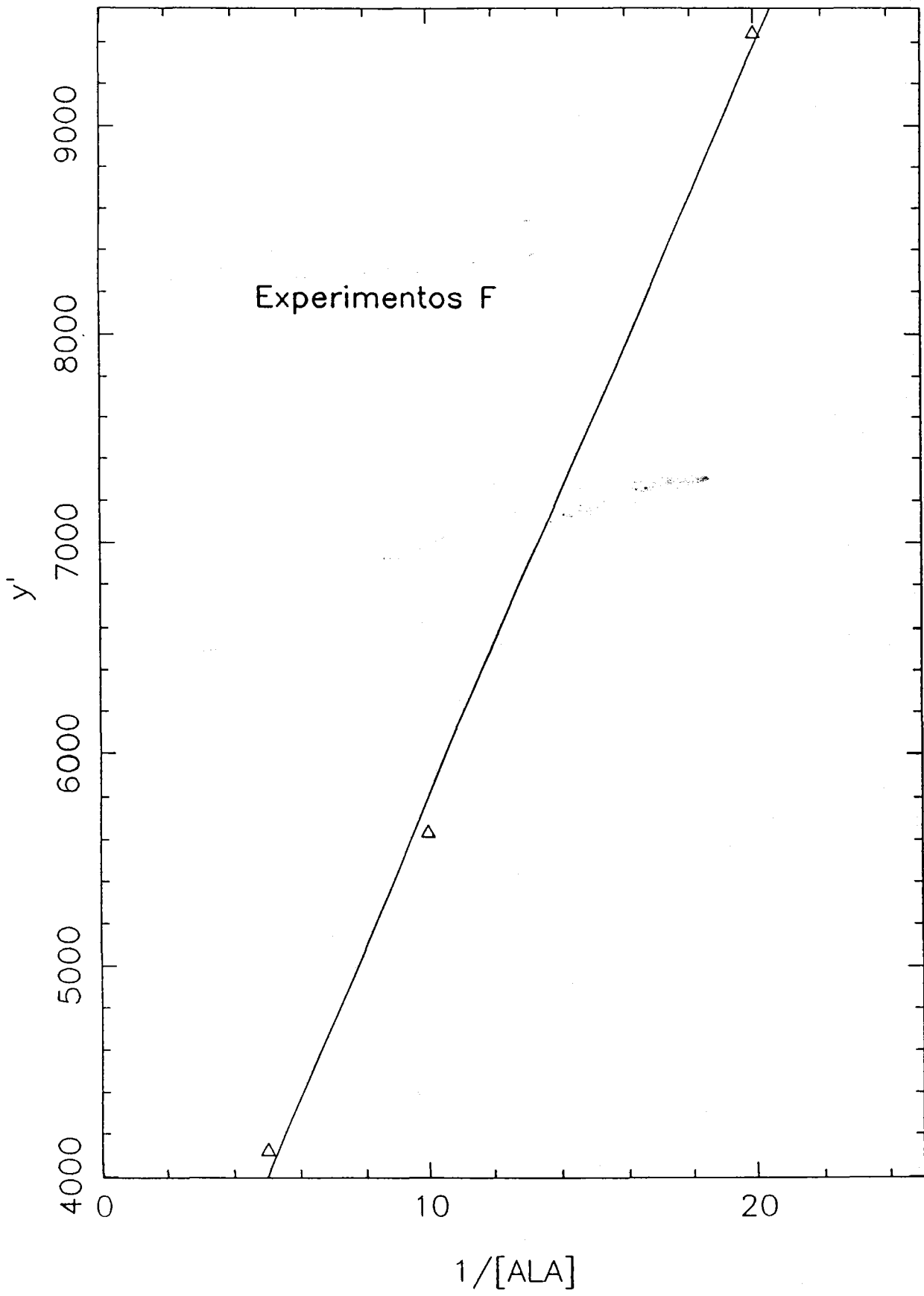
TABLA 6.23

<u>Exp</u>	<u>y - 0,298 (1/[O₂]_e)</u>	<u>1/[ALA]</u>
F.3	5631	10
F.5	4119	5
F.6	9441	20

y se observa que también se ajustan a la ecuación [6.47]. Por regresión lineal, se obtiene:

$$y - 0,298 \frac{1}{[O_2]_e} = 2214 + 358,5 \frac{1}{[ALA]} \quad [6.48]$$

Figura 6.12



Comparando esta última ecuación con [6.43] se obtiene:

$$r_{\max} = 0,000452 \frac{\text{mol}}{\text{genzima} \cdot \text{min}}$$

[6.49]

$$K_{ALA} = 6,175 \text{ M}$$

$$K_{O_2} = 0,000135 \text{ M}$$

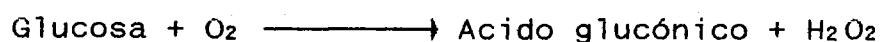
Si bien, el valor de K_{ALA} corresponde al sustrato utilizado que ha sido DL-Alanina por lo que K_{O-ALA} sería más pequeño.

7. CONCLUSIONES

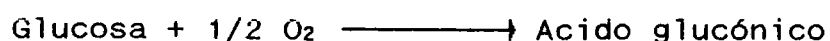
Como consecuencia de la presente investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- La utilización de un tanque agitado con superficie interfacial plana para llevar a cabo una reacción de oxidación con O₂ molecular, catalizada por una enzima, permite el estudio cinético de la misma en los dos sistemas utilizados en esta investigación, ya que se alcanza un estado cuasi-estacionario en tiempos inferiores a una hora, eliminando la influencia del retraso del electrodo de O₂ utilizado para la medida de la concentración de este. La posibilidad de variar el coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_L.a, fundamentalmente a través de a, permite adaptarse a oxidaciones de muy diferente velocidad.

2.- En el estudio de la oxidación de glucosa con oxígeno molecular en presencia de glucosa-oxidasa se ha encontrado que una concentración de catalasa de 0,0075 g/L es suficiente para decomponer, de forma instantánea, el peróxido de hidrógeno formado, y que la presencia de esta última enzima únicamente afecta a la estequiometría de la reacción global que tiene lugar. que es

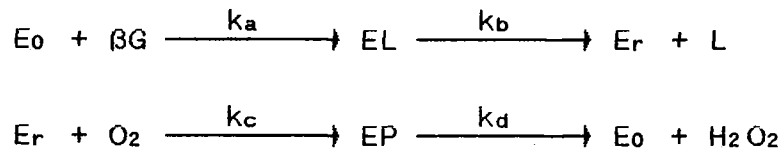


en ausencia de catalasa, y



en presencia de esta enzima.

3.- La interpretación de los experimentos de oxidación de glucosa con O₂ molecular en presencia de glucosa-oxidasa, utilizando el mecanismo usualmente admitido en la Bibliografía



que conduce a la ecuación cinética

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

permite explicar la influencia de la concentración de sustrato y enzima, obteniéndose los siguientes valores de los parámetros cinéticos para 25 °C y pH = 5,55

$$r_{\max} = 0,0145 \frac{\text{mol}}{\text{enzima} \cdot \text{min}}$$

$$K_{\beta G} = 0,120 \text{ M}$$

$$K_{O_2} = 0,000907 \text{ M}$$

que son del mismo orden, aunque algo superiores, a los valores encontrados en la Bibliografía.

4.- Sin embargo, el modelo anterior no permite explicar la influencia de la composición de la fase gaseosa y los resultados obtenidos en estos experimentos, dada la gran influencia de la concentración de O₂ en la interfase, sugieren la existencia de un

mecanismo directo de absorción de O_2 desde la fase gaseosa por las moléculas de enzima adsorbidas en la interfase, mecanismo que ha sido frecuentemente señalado para explicar la cinética de procesos de fermentación aerobios.

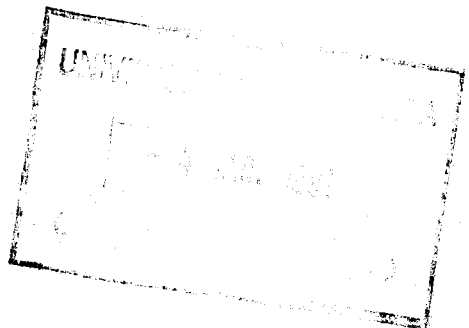
5.- Para explicar estos resultados se ha desarrollado un modelo con absorción directa en la interfase en la parte 5 de esta Memoria, suponiendo diferentes expresiones para el flujo de absorción directa, $N_{d.a}$, en función de las condiciones de operación. Así mediante la expresión

$$N_{d.a} = k_i.a [E_r] [O_2]_i [\beta G]$$

se ha podido explicar la influencia de la concentración de la fase gaseosa.

6.- Utilizando este mecanismo se ha desarrollado un modelo matemático que permite la simulación de los resultados experimentales obtenidos, teniendo en cuenta la cinética de mutarrotación y el retraso del electrodo. Este modelo reproduce aceptablemente los resultados experimentales, lo que confirma la validez de los parámetros cinéticos obtenidos y del mecanismo directo, puesto de manifiesto por los experimentos, variando la composición de la fase gaseosa.

7.- El estudio de la influencia de la temperatura sobre la cinética de la reacción enzimática considerada, pone de manifiesto que se produce una desnaturalización térmica apreciable de la glucosa-oxidasa en el intervalo de 30 a 50 °C, aunque no de la catalasa.



8.- Dado que la conclusión establecida anteriormente difiere apreciablemente de los resultados obtenidos por Malikkides y Weiland (1982), se ha realizado un estudio independiente de la desnaturización térmica de la glucosa-oxidasa, utilizando una modificación del método propuesto por Pifferi y col. (1981), para la medida de la actividad enzimática de la glucosa-oxidasa en unidades internacionales, que se propone en la parte 3 de esta Memoria.

9.- La desnaturización térmica de la glucosa-oxidasa se ha ajustado a una cinética de orden cero con

$$k_{d0} = 3,18 \cdot 10^{16} \exp[-118980/(R.T)], \text{ g/(L.min)}$$

que permite explicar los resultados obtenidos en el estudio de la influencia de la temperatura sobre la oxidación de la glucosa con O₂ molecular en presencia de glucosa-oxidasa y catalasa.

10.- En el estudio de la oxidación de alanina con oxígeno molecular en presencia de D-aminoácido-oxidasa y catalasa, en el que únicamente se ha estudiado la influencia de la concentración de sustrato y enzima, los resultados se ajustan al modelo indicado en la conclusión 3, con los siguientes valores de los parámetros cinéticos para 39 °C y pH = 7,3

$$r_{\max} = 0,000452 \frac{\text{mol}}{\text{genzima.min}}$$

$$K_{ALA} = 6,175 \text{ M}$$

$$K_{O_2} = 0,000135 \text{ M}$$

8. ANEXOS

ANEXO I

CALIBRADO DE LOS ROTAMETROS

El calibrado de los rotámetros de oxígeno y nitrógeno se realizó a temperatura ambiente, utilizándose para el mismo un contador de gases de burbuja. Los resultados obtenidos se recogen en las tablas A.1 y A.2, y se han representado en las figuras A.1 y A.2, representando L' la lectura de los rotámetros. También se debe indicar que el valor de tiempo tabulado, t , corresponde al valor medio de al menos cinco determinaciones.

TABLA A.1

Calibrado del rotámetro de nitrógeno

<u>Lectura</u>	<u>t, s</u>	<u>V, cm³</u>	<u>Q 10³, m³/h</u>
10	47,5	121	9,15
20	23,7	121	18,33
26	18,7	121	23,23
30	16,0	121	27,15
34	13,9	121	31,26
40	11,6	121	37,45
46	9,7	121	44,79
50	8,8	121	49,37

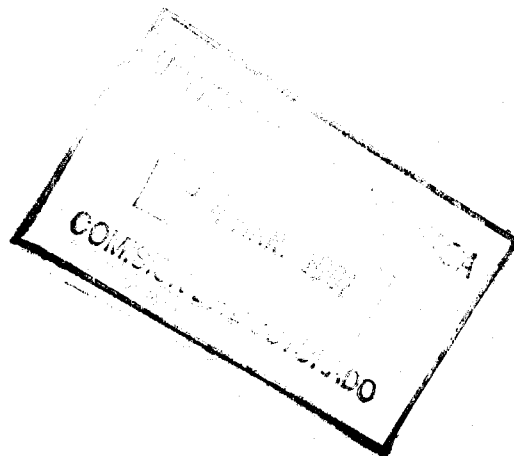


TABLA A.2

Calibrado del rotámetro de oxígeno

<u>Lectura</u>	<u>t, s</u>	<u>V, cm³</u>	<u>Q 10³, m³/h</u>
100	124,9	121	3,42
150	74,3	121	5,74
200	53,5	121	7,98
250	41,7	121	10,42
300	33,5	121	12,97
350	34,0	151	15,51
400	29,1	151	18,28
450	25,6	151	21,21
500	22,1	151	23,71
550	19,3	151	26,06
600	18,2	151	28,88
650	17,2	151	31,58
700	15,6	151	34,81
750	14,1	151	38,51

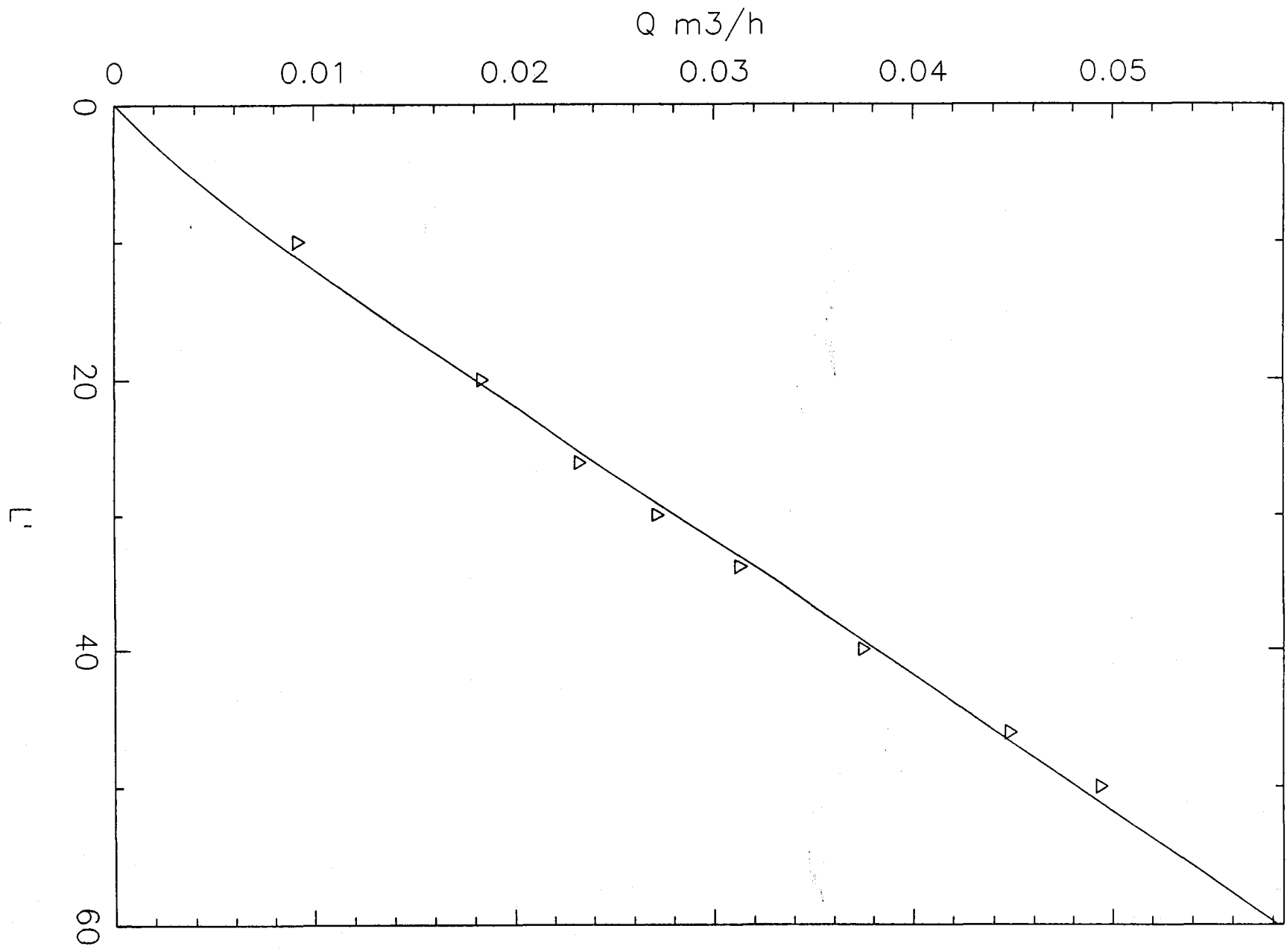
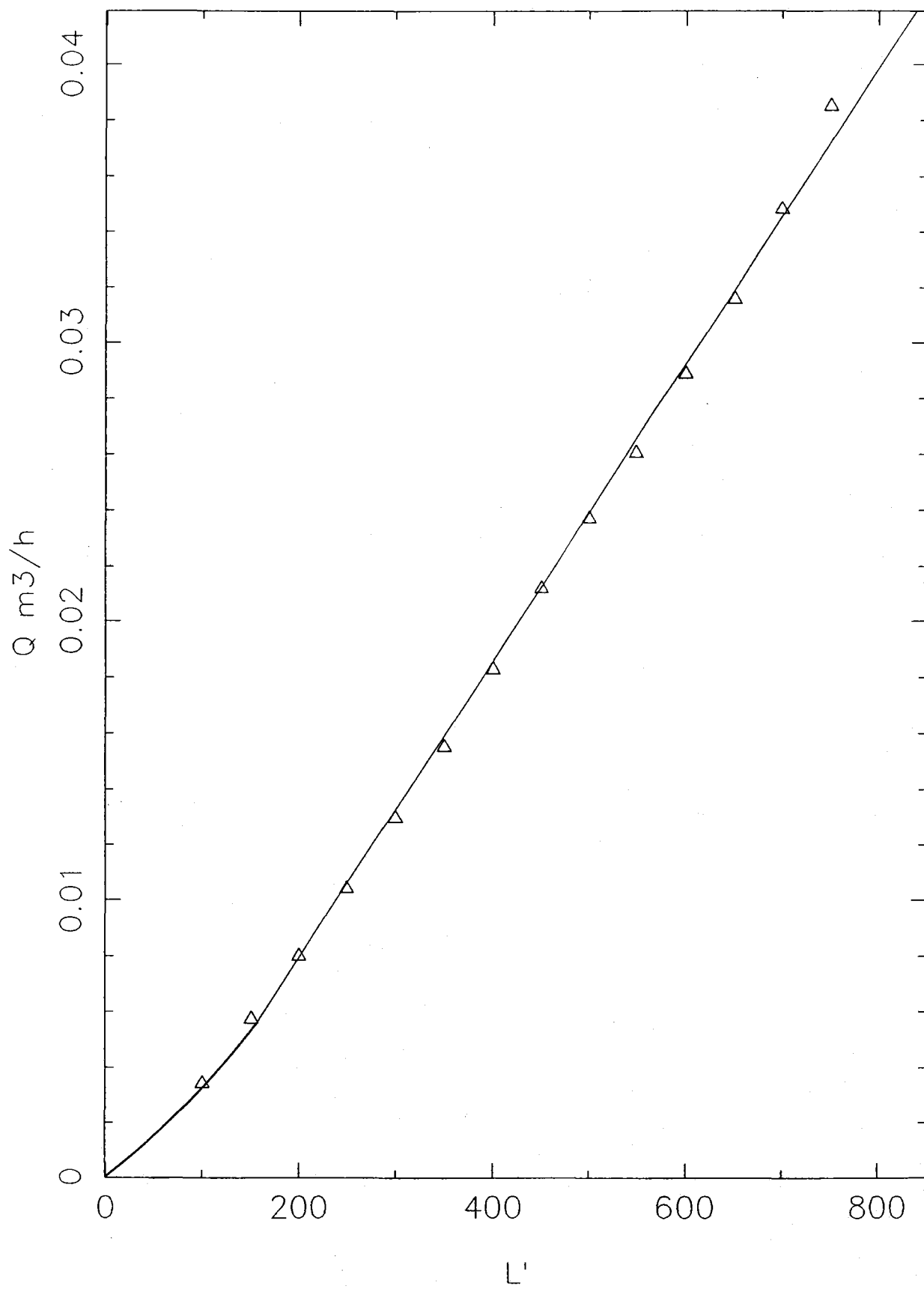


Figura A.1

Figura A.2



ANEXO II

SIMULACION DE LA OXIDACION DE GLUCOSA CON OXIGENO MOLECULAR CATALIZADA POR GLUCOSA-OXIDASA Y CATALASA

Para la simulación de los experimentos realizados con este sistema se partió de las ecuaciones [5.30]:

$$\frac{d[\alpha G]}{dt} = - (r_{\alpha\beta}) \quad [\text{II.1}]$$

$$\frac{d[\beta G]}{dt} = (r_{\alpha\beta}) - (-r_{\beta\beta}) \quad [\text{II.2}]$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = N_{O_2} \cdot a - (-r_{O_2}) \quad [\text{II.3}]$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} ([O_2]/[O_2]_i - c) \quad [\text{II.4}]$$

y su condición inicial [5.31]:

$$t=0 \quad [\alpha G]=[\alpha G]_e ; \quad [\beta G]=[\beta G]_e ; \quad [O_2]=[O_2]_i ; \quad c=1 \quad [\text{II.5}]$$

donde

$$(r_{\alpha\beta}) = 4,956 \cdot 10^{10} \exp\left[-\frac{8449}{T}\right] \left[[\alpha G] - \frac{[\beta G]}{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \right] \quad [\text{II.6}]$$

las expresiones de $(-r_{\alpha\beta})$ y $(-r_{O_2})$ corresponderían a las indicadas en la tabla 5.3 según el modelo cinético y mecanismo utilizados, así para el modelo de absorción gas-líquido y el

mecanismo 1:

$$(-r_{\beta G}) = \frac{r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [II.7]$$

$$(-r_{O_2}) = 1/2 (-r_{\beta G}) \quad [II.8]$$

y el flujo volumétrico

$$N_{O_2} \cdot a = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) \quad [II.9]$$

Finalmente los valores iniciales de las dos forma de glucosa serían:

$$[\alpha G]_e = \frac{[G]_0}{1 + 1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \quad [\beta G]_e = [G]_0 - [\alpha G]_e \quad [II.10]$$

con lo que el sistema de ecuaciones [II.1] a [II.5] queda:

$$\frac{d[\alpha G]}{dt} = -4,956 \cdot 10^{10} \exp\left[-\frac{8449}{T}\right] \left[[\alpha G] - \frac{[\beta G]}{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \right] \quad [II.11]$$

$$\frac{d[\beta G]}{dt} = 4,956 \cdot 10^{10} \exp\left[-\frac{8449}{T}\right] \left[[\alpha G] - \frac{[\beta G]}{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \right] - \quad [II.12]$$

$$- \frac{r_{\max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]}$$

$$\frac{d[O_2]}{dt} = k_L \cdot a ([O_2]_i - [O_2]) - \frac{1}{2} \frac{r_{max} [GO]}{1 + K_{\beta G}/[\beta G] + K_{O_2}/[O_2]} \quad [II.13]$$

$$\frac{dc}{dt} = k_{e1} \left[\frac{[O_2]}{[O_2]_i} - c \right] \quad [II.14]$$

$$t = 0; \quad [aG] = \frac{[G]_0}{1 + 1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]}; \quad [II.15]$$

$$[\beta G] = \frac{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right] [G]_0}{1 + 1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]}; \quad [O_2] = [O_2]_i; \quad c = 1$$

Este sistema debe ponerse en forma adimensional, para dar mayor generalidad a los resultados y facilitar la convergencia de los métodos numéricos necesarios para su resolución, mediante los siguientes cambios de variables:

$$\theta = k_L \cdot a \cdot t; \quad a = \frac{[aG]}{[G]_0}; \quad b = \frac{[\beta G]}{[G]_0}; \quad c = \frac{[O_2]}{[O_2]_i} \quad [II.16]$$

Sustituyendo las ecuaciones [II.16] en el sistema [II.11] a [II.15]:

$$\frac{da}{d\theta} = - \frac{4,956 \cdot 10^{10} \exp\left[-\frac{8449}{T}\right]}{k_L \cdot a} \left[a - \frac{b}{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \right] \quad [II.17]$$

$$\frac{db}{d\theta} = \frac{4,956 \cdot 10^{10} \exp\left[-\frac{8449}{T}\right]}{k_L \cdot a} \left[a - \frac{b}{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]} \right] -$$

[II.18]

$$- \frac{r_{\max} [GO]/(k_L \cdot a [G]_0)}{1 + \frac{K_{BG}}{[G]_0} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]_i} c_L}$$

$$\frac{dc_L}{d\theta} = 1 - c_L - \frac{1}{2} \frac{r_{\max} [GO]/(k_L \cdot a [O_2]_i)}{1 + \frac{K_{BG}}{[G]_0} + \frac{K_{O_2}}{[O_2]_i} c_L}$$

[II.19]

$$\frac{dc}{d\theta} = \left[\frac{k_{e1}}{k_L \cdot a} \right] (c_L - c)$$

[II.20]

$$\theta = 0; \quad a = \frac{1}{1 + 1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]}$$

[II.21]

$$b = \frac{1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]}{1 + 1,0146 \exp\left[\frac{152,8}{T}\right]}; \quad c_L = 1; \quad c = 1$$

Sistema que puede integrarse numéricamente mediante el método de Runge-Kutta de 4º orden, para lo cual se ha preparado el programa, escrito en PASCAL, que se indica a continuación:

```

PROGRAM SIMULATION_ABSORCION_ENZIMATICA;

USES CRT, PRINTER;

TYPE
PALABRA=STRING[3];
FICHERO=STRING[12];
VECTOR0=ARRAY [1..3] OF REAL;
VECTOR1=ARRAY [1..50] OF REAL;

VAR
NEX:PALABRA;
NOMBRE_FICHERO:FICHERO;
N,I,IMP:BYTE;
SSR,TEMP,k1a,ke1,rmax,KBG,KOX,KIa,GO,CT,GI,OXI,CI,TF,BE,CE:REAL;
AES,BES,CES,DES:VECTOR0;
TIEMPO,VA,VB,VC,VD,VDEXP:VECTOR1;
DATOS:TEXT;

PROCEDURE LEER_DATOS
(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;VAR NEX:PALABRA;VAR TEMP,GO,CT,GI,OXI,CI,
CE:REAL;VAR N:BYTE;VAR TIEMPO,VDEXP:VECTOR1);
BEGIN
  ASSIGN(DATOS,NOMBRE_FICHERO);
  RESET(DATOS);
  READLN(DATOS,NEX);
  READLN(DATOS,TEMP,GO,CT,GI,OXI,CI,CE);
  READLN(DATOS,N);
  FOR I:=1 TO N DO
    READLN(DATOS,TIEMPO[I],VDEXP[I]);
  CLOSE(DATOS)
END;

```

```

FUNCTION F14(T,A,B,C,D:REAL):REAL;
BEGIN
  F14:=-((4.956E10*EXP(-8449/TEMP)/k1a)*(A-
  B/(1.0146*EXP(152.8/TEMP)))
END;

FUNCTION F24(T,A,B,C,D:REAL):REAL;
BEGIN
  F24:=-F14(T,A,B,C,D)-
  ((rmax*GO)/(k1a*GI))/(1+KBG/(GI*B)+KOX/(OXI*C))
END;

FUNCTION F34(T,A,B,C,D:REAL):REAL;
BEGIN
  F34:=1-C-((rmax*GO)/(k1a*OXI))/(1+KBG/(GI*B)+KOX/(OXI*C))/CT
END;

FUNCTION F44(T,A,B,C,D:REAL):REAL;
BEGIN
  F44:=(ke1/k1a)*(C-D)
END;

FUNCTION DIVERGE(VALOR,MAXIMO,MINIMO:REAL):BOOLEAN;
BEGIN
  IF (VALOR>MAXIMO) OR (VALOR<MINIMO) THEN DIVERGE:=TRUE
  ELSE DIVERGE:=FALSE
END;

PROCEDURE RK44_ETAPA(DT:REAL;VAR TV,AV,BV,CV,DV:REAL);
VAR
  T,A,B,C,D,LA0,LA1,LA2,LA3,LB0,LB1,LB2,LB3,LC0,LC1,LC2,LC3,
  LD0,LD1,LD3:REAL;

```

BEGIN

```
T:=TV;A:=AV;B:=BV;C:=CV;D:=DV;
LA0:=DT*F14(T,A,B,C,D);LB0:=DT*F24(T,A,B,C,D);
LC0:=DT*F34(T,A,B,C,D);LD0:=DT*F44(T,A,B,C,D);
T:=TV+DT/2;A:=AV+LA0/2;B:=BV+LB0/2;C:=CV+LC0/2;D:=DV+LD0/2;
LA1:=DT*F14(T,A,B,C,D);LB1:=DT*F24(T,A,B,C,D);
LC1:=DT*F34(T,A,B,C,D);LD1:=DT*F44(T,A,B,C,D);
T:=TV+DT/2;A:=AV+LA1/2;B:=BV+LB1/2;C:=CV+LC1/2;D:=DV+LD1/2;
LA2:=DT*F14(T,A,B,C,D);LB2:=DT*F24(T,A,B,C,D);
LC2:=DT*F34(T,A,B,C,D);LD2:=DT*F44(T,A,B,C,D);
T:=TV+DT;A:=AV+LA2;B:=BV+LB2;C:=CV+LC2;D:=DV+LD2;
LA3:=DT*F14(T,A,B,C,D);LB3:=DT*F24(T,A,B,C,D);
LC3:=DT*F34(T,A,B,C,D);LD3:=DT*F44(T,A,B,C,D);
TV:=TV+DT;
AV:=AV+(LA0+2*LA1+2*LA2+LA3)/6;
BV:=BV+(LB0+2*LB1+2*LB2+LB3)/6;
CV:=CV+(LC0+2*LC1+2*LC2+LC3)/6;
DV:=DV+(LD0+2*LD1+2*LD2+LD3)/6;
```

END;

```
PROCEDURE ALMACEN4(DT,T,A,B,C,D:REAL;TIEMPO:VECTOR1;
VAR VA,VB,VC,VD:VECTOR1;VAR ND:BYTE);
```

BEGIN

```
IF (T<=TIEMPO[ND]) AND (T+DT>TIEMPO[ND]) THEN
```

```
  BEGIN
```

```
    VA[ND]:=A;VB[ND]:=B;VC[ND]:=C;VD[ND]:=D;
```

```
    ND:=ND+1
```

```
  END
```

END;

```
PROCEDURE RUNGEKUTTA44(TF:REAL;AES,BES,CES,DES:VECTOR0;TIEMPO:
```

```

                                VECTOR1; VAR VA,VB,VC,VD:VECTOR1);

CONST
P=0.01;
VAR
INDICE1,INDICE2,BOOLEAN;
ND:BYTE;
DT,T,A,B,C,D,AF,BF,CF,DF,EA,EB,EC,ED:REAL;
BEGIN
    DT:=0.1;INDICE1:=FALSE;INDICE2:=FALSE;
    WHILE INDICE2=FALSE DO
        BEGIN
            ND:=1;T:=0.;A:=AES[1];B:=BES[1];C:=CES[1];D:=DES[1];
            WHILE T<TF DO
                BEGIN
                    RK44_ETAPA(DT,T,A,B,C,D);
                    IF INDICE1=FALSE THEN
                        BEGIN
                            IF DIVERGE(A,AES[2],AES[3]) OR
                                DIVERGE(B,BES[2],BES[3]) OR
                                DIVERGE(C,CES[2],CES[3]) OR
                                DIVERGE(D,DES[2],DES[3]) THEN
                                BEGIN
                                    DT:=DT/2;T=0.;A:=AES[1];B:=BES[1];C:=CES[1];D:=DES[1]
                                END
                            END
                        ELSE
                            BEGIN
                                ALMACEN4(DT,T,A,B,C,D,TIEMPO,VA,VB,VC,VD,ND);
                            END
                        END;
                END;
            END;

```

```

IF INDICE1=TRUE THEN
BEGIN
    EA:=ABS((AF-A)/AF);EB:=ABS((BF-B)/BF);
    EC:=ABS((CF-C)/CF);ED:=ABS((DF-D)/DF);
    AF:=A;BF:=B;CF:=C;DF:=D;
    IF (EA<P) AND (EB<P) AND (EC<P) AND (ED<P)
    THEN INDICE2:=TRUE ELSE DT:=DT/2
END
ELSE
BEGIN
    INDICE1:=TRUE;AF:=A;BF:=B;CF:=C;DF:=D;
    DT:=DT/2
END
END
END;

BEGIN
    IMP:=0;k1a:=0.033;ke1:=3;
    WRITELN('FICHERO DE DATOS,rmax,BE');
    READLN(NOMBRE_FICHERO,rmax,BE);
    LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,NEX,TEMP,GO,CT,GI,OXI,CI,CE,N,TIEMPO,
    VDEXP);
    KOX:=0.00675*rmax;
    KBG:=(GO/(CT*k1a*OXI*(1-CE))-0.00675/(OXI*CE)-55.65/CE-
    1/rmax)*BE*GI*rmax;
    KIa:=55.65*rmax/KBG;
    AES[1]:=1./(1.+1.0146*EXP(152.8/TEMP));AES[2]:=AES[1];
    AES[3]:=0.;
    BES[1]:=1.-AES[1];BES[2]:=BES[1];BES[3]:=0.;
    CES[1]:=CI;CES[2]:=CES[1];CES[3]:=0.;
    DES[1]:=CI;DES[2]:=DES[1];DES[3]:=0.;

```



```

TF:=TIEMPO[N]*k1a;
FOR I:=1 TO N DO
BEGIN
    TIEMPO[I]:=TIEMPO[I]*k1a;
END;
RUNGEKUTTA44(TF,AES,BES,CES,DES, TIEMPO,VA,VB,VC,VD);
CLRSCR;
WRITELN('                EXPERIMENTO ',NEX);
WRITELN('  PARAMETROS CINETICOS:');
WRITELN('  rmax=',rmax:6:4,'  KBG=',KBG:6:4,'  KOX=',KOX:9:7,
        '  KIa=',KIa:6:4);
WRITELN('  TIEMPO  ', ' ALFA-GLUCOSA ', ' BETA-GLUCOSA ',
        '  OXIGENO  ', ' LECTURA-CALC ', ' LECTURA-EXP ');
WRITELN('  0',AES[1]:14:3,BES[1]:14:3,CES[1]:14:3,
        DES[1]:14:3,CI:14:3);
SSR:=0.;
FOR I.=1 TO N DO
BEGIN
    TIEMPO[I]:=TIEMPO[I]/k1a;
    WRITELN(TIEMPO[I]:6:0,VA[I]:14:3,VB[I]:14:3,
            VC[I]:14:3,VD[I]:14:3,VDEXP[I]:14:3);
    SSR:=SSR+SQRT(SQR((VD[I]-VDEXP[I])/VDEXP[I]))
END;
WRITELN;
WRITELN('  SSR =',(SSR/N):6:4);
WRITELN('DESEA IMPRIMIR LOS DATOS(1):');
READLN(IMP);
IF (IMP=1) THEN
BEGIN

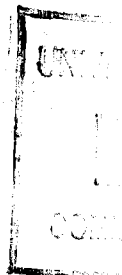
```

```

WRITELN(LST);
WRITELN(LST);
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'                                EXPERIMENTO ',NEX);
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'    PARAMETROS CINETICOS:');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'    rmax=',rmax:6:4,'    KBG=',KBG:6:4,'    KOX=',
            KOX:9:7,'    KIa=',KIa:6:4);
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'    TIEMPO',' ALFA-GLUCOSA',' BETA-GLUCOSA',
            '    OXIGENO',' LECTURA-CALC',' LECTURA-EXP ');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'    0',AES[1]:12:3,BES[1]:12:3,CES[1]:12:3,
            DES[1]:12:3,CI:12:3);
WRITELN(LST);
FOR I:=1 TO N DO
BEGIN
    WRITELN(LST,TIEMPO[I]:6:0,VA[I]:12:3,VB[I]:12:3,
            VC[I]:12:3,VD[I]:12:3,VDEXP[I]:12:3);
    WRITELN(LST)
END;
WRITELN(LST);
WRITE(LST,'    SSR =',(SSR/N):6:4)
END
END.

```


9. NOMENCLATURA



Las variables que se relacionan a continuación corresponden fundamentalmente a los apartados 5 y 6 de esta Memoria.

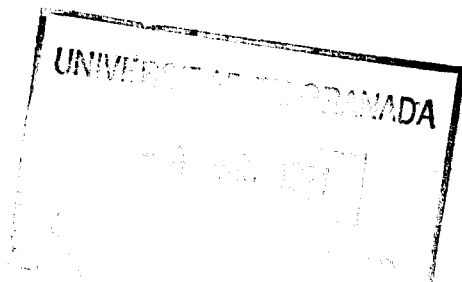
A	- Area interfacial, m^2
a	- Area interfacial específica, m^{-1}
c	- Lectura del electrodo, %
CT	- Catalasa
D	- Difusividad molecular, cm^2/s o m^2/h
D_0	- Difusividad correspondiente al agua pura
D_M	- Difusividad del oxígeno en la membrana, m^2/h
E_0	- Forma oxidada de la enzima
E_r	- Forma reducida de la enzima
EL	- Complejo intermedio formado entre la enzima y la lactona
EP	- Complejo intermedio formado entre la enzima y el peróxido de hidrógeno
G	- Glucosa
αG	- α -glucosa
βG	- β -glucosa
GO	- Glucosa-oxidasa
H_0	- Constante de la ley de Henry, para agua pura, $mm\ Hg/(mol.L)$
H_d	- Valor correspondiente a la disolución considerada
K_e	- Constante de equilibrio de adsorción, definida en la ecuación [5.42]
K_g	- Constante definida en la ecuación [5.36]

$K_{\beta G}$	- Constante definida en la ecuación [5.16]
K_M	- Constante de equilibrio de mutarrotación
K_{O_2}	- Constante definida en la ecuación [5.16]
k	- Parámetros cinéticos, con un subíndice número o letra
$k_{L.a}$	- Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, min^{-1}
k_{e1}	- Constante de tiempo del electrodo, min^{-1}
$k_{i.a}$	- Coeficiente cinético del mecanismo directo, definido por la ecuación [5.43]
$k_{i.a}$	- Coeficiente cinético del mecanismo directo, definido por la ecuación [6.25]
k_m	- Constante cinética de mutarrotación, min^{-1}
L	- Lactona
$N_{d.a}$	- Densidad de flujo volumétrico del mecanismo directo, $\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{m}^3)$
N_{O_2}	- Densidad de flujo de oxígeno a través de la interfase, $\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{m}^2)$
$N_{O_2.a}$	- Densidad de flujo volumétrico de oxígeno a través de la interfase, $\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{m}^3)$
$[O_2]$	- Concentración de oxígeno en el seno de la fase líquida, M
$[O_2]_i$	- Concentración de oxígeno en la interfase, M
$[O_2]^*$	- Concentración de oxígeno de saturación con respecto de la fase gaseosa, M
P_T	- Presión total (atmosférica), mm Hg
P_{O_2}	- Presión parcial de oxígeno, mm Hg
$-r_G$	- Velocidad de consumo de glucosa, $\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
$-r_{\beta G}$	- Velocidad de oxidación de la β -glucosa, $\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$
r_{\max}	- Velocidad máxima de la reacción enzimática, $\text{mol}/(\text{enzima} \cdot \text{min})$

- r_{O_2} - Velocidad de consumo de oxígeno, $M \cdot \text{min}^{-1}$
- r_{aB} - Velocidad de mutarrotación, $M \cdot \text{min}^{-1}$
- T - Temperatura, $^{\circ}\text{C}$ o K
- t - Tiempo, min
- V - Volumen de fase líquida, m^3
- Y_L - Concentración normalizada de oxígeno en la fase líquida
- Y_P - Respuesta normalizada del electrodo para un experimento dinámico de aireación
- Y_P^1 - Respuesta normalizada del electrodo ante un impulso en escalón
- y_{O_2} - Fracción molar de oxígeno en la fase gaseosa

La concentración de una sustancia se ha representado encerrando entre corchetes la letra o letras que simbolizan dicha sustancia. El subíndice 0 representa condiciones iniciales y el subíndice e condiciones del estado cuasi-estacionario.

10. BIBLIOGRAFIA



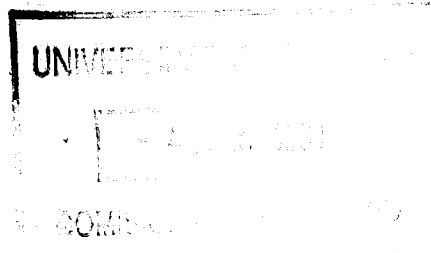
- Aiba, S. y Huang, S. Y.: Chem. Eng. Sci., 24, 1149 (1969)
- Aiba, S.; Koizumi, J.; Ru, J. S. y Mukhopadhyay, S. N.: Biotechnol. Bioeng., 26, 1136 (1984)
- Aiba, S.; Ohashi, M. y Huang, S. Y., Ind. Eng. Chem. Fundam., 7, 497 (1968)
- Akita, K.: Ind. Eng. Chem. Fundam., 20, 89 (1981)
- Bandyopadhyay, B.: Humphrey, A. E. y Taguchi, H.: Biotechnol. Bioeng., 9, 533 (1967)
- Bartholomew, W. H.; Karow, E. O.; Sfat, M. R. y Wilhelm, R. H.: Ind. Eng. Chem., 42, 1801 (1950)
- Battino, R. y Clever, H. L.: Chem. Rev., 60, 395 (1966)
- Benedek, A. A. y Heideger, W. J.: Water Res., 4, 627 (1970)
- Bennett, G. F. y Kempe, L. L.: Biotechnol. Bioeng., 6, 347 (1964)
- Bingham, E. C.: J. Phys. Chem., 45, 885 (1941)
- Bright, H. J. y Appleby, M.: J. Biol. Chem., 244, 3625 (1969)
- Bright, H. J. y Gibson, Q. H.: J. Biol. Chem., 242, 994 (1967)
- Calderbank, P. H. y Moo-Young, M. B.: Chem. Eng. Sci., 16, 39 (1961)
- Camacho, F.; Delgado, S.; Díaz, F. y Limiñana, G.: An. Qui., 72, 285 (1976)
- Camacho, F.; Delgado, S.; Díaz, F. y Limiñana, G.: An. Qui., 73, 132 (1977)
- Camacho, F.; Hernández, J. y Limiñana, G.: An. Qui., 76, 106 (1980)
- Camacho, F.; Martín, A. y Bravo, V.: An. Qui., 76, 265 (1980)
- Camacho, F. y Páez, M^a. P.: An. Qui., 81, 519 (1985)
- Camacho, F.; Páez, M^a. P. y Blázquez, G.: An. Qui., 82, 584 (1986)
- Chance, B.: Acta Chem. Scand., 1, 236 (1947)

- Chance, B.: Arch. Biochem. Biophys., 71, 130 (1957)
- Charpentier, J.C.: "Advances in Chemical Engineering", Academic Press, 11, 1 (1981)
- Danckwerts, P. V.: Ind. Eng. Chem., 43, 1460 (1951)
- Danckwerts, P. V.: "Gas-liquid Reactions", McGraw-Hill (1970)
- Dang, N. D. P.; Karrer, D. A. y Dunn. I. J.: Biotechnol. Bioeng., 19, 853 (1977)
- Davies, J. T.: Proc. R. Soc., A290, 515 (1966)
- Duke, F. R.; Weibel, M.; Page, D. S.; Bulgrin, V. G. y Luthy, J.: J. Am. Chem. Soc., 91, 3904 (1969)
- Dunn, I. J. y Einsele, A.: J. Appl. Chem. Biotechnol., 25, 707 (1977)
- Fatt, I.: "Polarographic Oxygen Sensors", Robert E. Krieger Publishing Co., Florida (1982)
- Fiechter, A.: "Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology", Springer-Verlag, 30, 7 (1984)
- Froment, G. F. y Bischoff, K. B.: "Chemical Reactor Analysis and Design", John Wiley , 178 (1978)
- Fuchs, R.; Ryu, D. D. Y y Humphrey. A. E.: Ind. Eng. Chem. Process. Des. Develop., 10, 190 (1971)
- Fukushima, S.; Uyama, A. y Katayama S.: J. Chem. Eng. Jpn., 11, 227 (1978)
- Gibson, Q. H. y Milnes. L: Biochem. J., 91, 161 (1964)
- Gibson, Q. H.; Swoboda B. E. P. y Massey, V.: J. Biol. Chem., 239, 3927 (1964)
- Gubbins, K. E.; Bhatia, K. K. y Walker, R. D.: AIChE J., 12, 548 (1966)
- Gram, F.; Hveding, J. A. y Reine, A.: Acta Chem. Scand., 27, 3616 (1973)
- Heineken, F. G.: Biotechnol. Bioeng., 12, 145 (1970)

- Heineken, F. G.: *Biotechnol. Bioeng.*, 13, 599 (1971)
- Higbie, R.: *Trans. Am. Inst. Chem. Eng.*, 35, 365 (1935)
- Hikita, H.; Asai, S. y Azuma, Y.: *Can. J. Chem. Eng.*, 56, 371 (1978)
- Hikita, H.; Asai, S.; Ishikawa, H.; Seko, M. y Kitajima, H.: *Chem. Eng. J.*, 17, 77 (1979)
- Hikita, H.; Ishikawa, H. y Matsuda, M.: *Can. J. Chem. Eng.*, 58, 594 (1980)
- Himmelblau, D. M.: *Chem. Rev.*, 64, 527 (1964)
- Hiss, T. G. y Cussler, E. L.: *AIChE J.*, 19, 698 (1973)
- Hixson, A. W. y Gaden, E. L.. Jr.: *Ind. Eng. Chem.*, 42, 1792 (1950)
- Holtzapple, M. T.; Matthews, M. A. y Eubank, P. T.: *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 964 (1989)
- Ho, C. S.; Ju, L. y Ho, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1086 (1986)
- Hsieh, P. P. H.; Silver, R. S. y Mateles, R. I.: *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 1 (1969)
- King, C. J.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 5, 1 (1966)
- Johnson, M. J.: *J. Bacteriol.*, 94, 181 (1967)
- Ju, L. y Ho, C. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1495 (1985)
- Ju, L.; Ho, C. S. y Baddour, R. F.: *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 995 (1988)
- Ju, L.; Livio, E. y Ho, C. S.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 15, 347 (1986)
- Kappeli, D. y Fiechter, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2519 (1982)
- Koc, R. y Zajic, J. E.: *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 527 (1975)

- Kolthoft, I. M.; Sandell, E. B.; Meehan, E. J. y Bruckenstein, S.: "Análisis Químico Cuantitativo", Ed. Nigar, S.R.L., Buenos Aires (1972)
- Kulkarni, B. D. y Doraiswamy, L. K.: AICHE J., 21, 501 (1975)
- Kulkarni, B. D. y Doraiswamy, L. K.: AICHE J., 22, 597 (1976)
- van Krevelen, D. W. y Hoftijzer, P. J.: Rec. Trav. Chim., 67, 563 (1948)
- van Krevelen, D. W. y Hoftijzer, P. J.: Chem. et Ind., 21º Congreso Internacional de Química Industrial, Bruselas (1948)
- Kutsche, I.; Gildehaus, G.; Schuller, D. y Schumpe, A.: J. Chem. Eng. Data., 29, 286 (1984)
- Lamourelle, A. P. y Sandall, D. C.: Chem. Eng. Sci., 27, 1035 (1972)
- Laser, H.: Proc. Roy. Soc.(London), B140, 230 (1952)
- Lee, Y. H. y Luk, S.: "Annual Reports on Fermentation Processes", 6, 101 (1983)
- Lee, Y. Y. y Tsao G. T. : Chem. Eng. Sci., 27, 1601 (1972)
- Linek, V.: Biotechnol. Bioeng., 14, 285 (1972)
- Linek, V. y Benes, P.: Biotechnol. Bioeng., 19, 741 (1977)
- Linek, V. y Benes, P.: Biotechnol. Bioeng., 20, 903 (1978)
- Linek, V., Benes, P.; Hovorka, F. y Holecek, O.: Biotechnol. Bioeng., 23, 1467 (1981)
- Linek, V.; Benes, P.; Sinkule, J.; Holecek, O. y Maly, V.: Biotechnol. Bioeng., 22, 2515 (1980)
- Linek, V.; Benes, P.; Sinkule, J. y Krivsky, Z.: Ind. Eng. Chem. Fundam., 17, 298 (1978)
- Linek, V. y Mayrhoferova, J.: Chem. Eng. Sci., 25, 787 (1970a)
- Linek, V.; Mayrhoferova, J. y Mosnerova, J.: Chem. Eng. Sci., 25, 1033 (1970b)
- Linek, V. y Sinkule, J.: Biotechnol. Bioeng., 25, 1401 (1983)

- Linek, V.; Sobotka, M y Prokop, A.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 4, 429 (1973)
- Linek, V. y Vacek, V.: *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 983 (1977)
- Linek, V.; Vacek, V.; Benes, P. y Sinkule, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 39 (1989)
- Longmuir, I. S.: *Biochem. J.*, 57, 81 (1954)
- Lundsgaard, J. S.; Gronlund J. y Degn, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 809 (1978)
- Makovos, E. B. y Liu, C. C.: *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 167 (1985)
- Menez, G. D. y Sandall, O. C.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 13, 72 (1974)
- Morbidelli, M.; Carra, S. y Servida, A.: "Frontiers in Chemical Reaction Engineering", 1, 440 (1984)
- Nakamura, T. y Ogura, Y: *Biochem. J.*, 52, 214 (1962)
- Onda, K.; Sada, E.; Kobayashi, T.; Kito, S. e Ito, K.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, 3, 18 (1970)
- Onda, K.; Sada, E.; Kobayashi, T.; Kito, S. e Ito, K.: *J. Chem. Eng. Jpn.*, 3, 137 (1970)
- Páez, M^a. P.: Tesis Doctoral, Granada (1982)
- Perry, R. H. y Green, D.: "Perry's Chemical Engineers' Handbook", 6^a Ed., McGraw-Hill (1984)
- Pifferi, P. G.; Lanzarini, G. y Biancani, M.: *Ann. Chim.(Rome)*, 71, 729 (1981)
- Pinto, N. de G. y Graham, E. E.: *AIChE J.*, 32, 291 (1986)
- Prokop, A.; Votruba, J.; Sobotka, M. y Linek, V.: *Chem. Equip. Des. Automat. CHISA'75*, 5^o Congreso Internacional de Ingeniería Química, Praga (1975)
- Quicker, A.; Schumpe, A.; Köning y Deckwer, W. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 635 (1981)



- Ratcliff, G. A. y Holdcroft, J. G.: Trans. Inst. Chem. Eng., 41, 315 (1963)
- Ruchti, G.; Dunn, I. J. y Bourne, J. R.: Biotechnol. Bioeng., 23, 277 (1981)
- Schumpe, A.; Adler, I. y Deckwer, W. D.: Biotechnol. Bioeng., 20, 145 (1978)
- Schumpe, A. y Deckwer, W. D.: Biotechnol. Bioeng., 21, 1075 (1979)
- Schumpe, A.; Quicker, G. y Deckwer, W. D.: Adv. Biochem. Eng., 24, 1 (1982)
- Siegell, S. D. y Gaden, E. L.: Biotechnol. Bioeng., 4, 345 (1962)
- Sobotka, M.; Votruba, J. y Prokop, A.: Biotechnol. Bioeng., 23, 1193 (1981)
- Tsao, G. T.: Biotechnol. Bioeng., 10, 765 (1968)
- Tsao, G. T.: Biotechnol. Bioeng., 12, 51 (1970)
- Tsao, G. T. y Lee, Y. H.: "Annual Reports on Fermentation Processes", 1, 115 (1977)
- Vardar, F. y Lilly, M. D.: Biotechnol. Bioeng., 24, 1711 (1982)
- Vivian, J. E. y King, C. J.: AIChE J., 10, 220 (1964)
- Votruba, J. y Sobotka, M.: Biotechnol. Bioeng., 18, 1815 (1976)
- Votruba, J.; Sobotka, M. y Prokop, A.: Biotechnol. Bioeng., 19, 435 (1977)
- Votruba, J.; Sobotka, M. y Prokop, A.: Biotechnol. Bioeng., 20, 913 (1978)
- Weibel, M. K. y Bright, H. J.: J. Biol. Chem., 246, 2734 (1971)
- Westerterp, K. R.; van Swaij, W. P. M. y Beenackers, A. A. C. M.: "Chemical Reactor Design and Operation", John Wiley, 386 (1984)
- Whitman, W. G.: Chem. Metall. Eng., 29, 147 (1923)

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de
la fecha, constituido por:

- D. _____
- D. _____
- D. _____
- D. _____
- D. _____

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don

se acordó por _____ otorgar la califica-

ción de _____
y para que conste, se extiende firmada por los
componentes del Tribunal, la presente diligen-
cia.

Granada, a _____ de _____

El Secretario,

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,