

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 010**

51 Int. Cl.:

C12P 7/44 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2004 E 04702190 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **26.10.2005 EP 1587936**

54 Título: **Método para controlar reacciones de biooxidación**

30 Prioridad:

14.01.2003 US 439991 P

13.01.2004 US 756240

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.02.2013

73 Titular/es:

**COGNIS IP MANAGEMENT GMBH (100.0%)
HENKELSTRASSE 67
40589 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, KEVIN, W. y
WENZEL, J., DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 395 010 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para controlar reacciones de biooxidación

Antecedentes de la invención

5 Enzimas y microorganismos, a través de la reducción directa del oxígeno molecular, catalizan naturalmente gran variedad de reacciones de oxidación. Estas reacciones altamente irreversibles pueden ser consideradas como bastante violentas desde una perspectiva bioquímica liberando gran cantidad de energía libre de reacción en forma de calor. El mecanismo fundamental por medio del cual ocurren biooxidaciones muy diversas de sustratos orgánicos puede considerarse generalmente, en primer lugar, como la activación de oxígeno molecular para formar una especie de oxígeno altamente reactivo. Esto es seguido por un desplazamiento de los electrones desde el sustrato hasta la especie activada de oxígeno que resulta en la oxidación neta del sustrato. Los átomos originales de oxígeno del oxígeno molecular pueden o no ser incorporados en el sustrato orgánico para elaborar el producto de oxidación deseado. La reacción puede ser catalizada por medio de una sola enzima o a través de la acción coordinada de múltiples enzimas. Muchas enzimas y sistemas enzimáticos que contienen, citocromos, monooxigenasas, dioxigenasas, desaturasas y las oxidasas, son capaces de aprovechar el poder reactivo del oxígeno molecular para la oxidación de sustratos orgánicos con una selectividad y especificidad sin precedentes por medio de síntesis química clásica.

10 Existe un gran incentivo para explotar estas reacciones mediante su aplicación a sustratos químicos ordinarios por medio de la adición de una o más funciones químicas en posiciones particularmente deseables en la molécula sustrato. Debido a la selectividad y especificidad de ciertos biocatalizadores, se pueden eliminar muchas reacciones químicas y etapas de purificación con su producto concomitante y pérdidas de sustrato. Alternativamente, estas reacciones pueden ayudar a la degradación de los productos químicos no deseados, nuevamente mediante la adición de una función a la molécula haciéndola más fácil de secuestrar para su eliminación o degradación adicional en etapas de transformación subsiguientes.

25 Existen muchas barreras que superar para operar con éxito estas reacciones con fines comerciales. La generación de especies de oxígeno altamente reactivas es, en términos metabólicos, una reacción violenta. Estos compuestos intermedios reactivos pueden dañar o degradar el biocatalizador, destruir la actividad enzimática en la búsqueda por lograr la transformación deseada, o una reacción no selectiva con el sustrato. Como ha señalado Stryer en su texto "Bioquímica", *El peligro acecha en la reducción del oxígeno*. Los organismos que utilizan oxígeno molecular poseen enzimas y sistemas enzimáticos para depurar los radicales de oxígeno de naturaleza renegada. En las reacciones de biooxidación rápida que ocurren en fermentaciones industriales, tales radicales puede sobrepasar los niveles de origen natural de estos sistemas depuradores. Como resultado, en las células viables que involucran reacciones de biooxidación, es común observar un rápido decaimiento en la viabilidad celular y la recuperación de las células viables (Dixon, B., "Viable but Nonculturable", ASM News, 64, páginas 372 - 373, 1998).

35 Amplios rangos de las moléculas orgánicas son sustratos potenciales para biooxidación, sin limitación por la preferencia del sustrato natural de la ruta de oxidación, para elaborar muchos productos de oxidación. Ciertas características del sustrato pueden dictar cómo se combinará con el catalizador de oxidación para efectuar la oxidación. El sustrato puede

- 1) ser tóxico, desactivar el catalizador,
- 2) ser volátil y susceptible de perderse en la salida de gases del fermentador,
- 40 3) reprimir su propia oxidación,
- 4) inducir o causar reacciones secundarias no deseadas,
- 5) ser costoso; depositar grandes cantidades de sustrato en el recipiente añade riesgo, puede fallar el lote por causa de una falla del equipo o contaminación,
- 6) generar reacciones de oxidación no selectivas u otras reacciones,
- 45 7) causan problemas en la recuperación o purificación del producto,
- 8) pueden formar mezclas explosivas con el aire.

Por estas razones, a menudo es deseable añadir el sustrato de manera continua o en incrementos medidos en forma discreta durante la fermentación en un modo de operación alimentado por lotes para minimizar la acumulación

de sustrato.

5 A pesar de la gran cantidad de energía libre termodinámicamente disponible a partir de muchas reacciones de biooxidación, estas reacciones tienden a ser altamente irreversibles liberando mucha de la energía libre de reacción en forma de calor en lugar de como formas útiles para el trabajo metabólico. Esto es debido a la entrada de energía metabólica inicial necesaria para crear la especie reducida de oxígeno a partir del oxígeno molecular. Para generar esta energía metabólica necesaria dirigiendo la reacción de biooxidación deseada y manteniendo el biocatalizador, se suministra un segundo sustrato al sistema de reacción. Este segundo sustrato se denomina frecuentemente el cosustrato y puede ser seleccionado entre cualquiera entre una cantidad de compuestos fermentables de uso común para la fermentación, por ejemplo, sacáridos, ácidos orgánicos, alcoholes o hidrocarburos. Por razones similares a las del sustrato de biooxidación, puede ser deseable añadir el cosustrato de manera continua o en incrementos medidos en forma discreta para minimizar la acumulación del cosustrato.

10 Se conoce en el arte algún control de la concentración de sustrato. Por ejemplo, la concentración del sustrato ML236B Na fue controlada en una reacción de hidroxilación mediada por citocromo P450 para elaborar pravastatina. Un módulo de filtración de flujo cruzado y una bomba peristáltica generaron un filtrado. Este filtrado fue periódicamente analizado por medio de HPLC automatizado para obtener una medición en tiempo real de la concentración de ML236B Na en la mezcla de reacción acuosa. El sistema de flujo cruzado funcionó bien con el sustrato soluble aparentemente porque la cepa no formó precipitados grandes y no había presentes sustancias oleosas en la mezcla de reacción. Sin embargo, no se aplicó control a la alimentación del cosustrato de glucosa al 50% que se mantuvo constante durante el transcurso de la reacción.

20 Por lo tanto, existe la necesidad por métodos para controlar simultáneamente la adición de múltiples corrientes de alimentación en el campo de las biooxidaciones. Los sustratos, cosustratos, y productos de biooxidación son frecuentemente moléculas complejas que pueden ser muy poco solubles en sistemas acuosos que, junto con el biocatalizador, constituyen una matriz compleja de reacción. Aunque se pueden aplicar una variedad de técnicas de análisis fuera de línea para el análisis de productos, sustratos y cosustratos, tales métodos tienden a ser laboriosos y de poco valor para control en tiempo real de la alimentación de nutrientes en estas reacciones alimentadas por lotes. Por lo tanto, uno se siente motivado a buscar métodos rápidos computarizados para controlar simultáneamente la alimentación de sustrato y de cosustrato a las reacciones de biooxidación.

25 En contraste, la fase gaseosa es una matriz relativamente simple para la cual se encuentran disponibles una variedad de instrumentos para realizar las mediciones de la composición de la fase gaseosa. Cuando se combina con una medición del flujo de gas hacia y desde la reacción de biooxidación, los balances de toda la fase gaseosa y sus componentes proporcionan una medición en tiempo real de la tasa de evolución de dióxido de carbono (CER) y la tasa de consumo de oxígeno (OUR).

30 El concepto de control de la alimentación de nutrientes en fermentaciones alimentadas por lotes mediante balances de los componentes del gas es conocido en la técnica. En particular, se han utilizado las mediciones del balance de componentes del gas para calcular y controlar la concentración del sustrato o para controlar la tasa de crecimiento específico.

35 Carragher et al: divulga en el artículo "The use of oxygen uptake rate measurements to control the supply of toxic sustrato: Toluene hydroxylation by *Pseudomonas putida* UV4" en *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 28, no. 2 - 3, 1 de febrero de 2001, páginas 138 - 188 un proceso para controlar la hidroxilación de tolueno por medio de *Pseudomonas putida* UV4. El tolueno que es un sustrato tóxico es alimentado por medio de un sistema de control automático en respuesta a un consumo alto de oxígeno y la tasa de evolución de CO₂. Se alimenta el cosustrato etanol en respuesta a la concentración de etanol medida en ambos donde es claro que la tasa de consumo de etanol es visible por medio de la tasa de producción de CO₂.

Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

45 La figura 1 muestra un diagrama de flujo de los gases entran y salen de un reactor de biooxidación con una ubicación típica de los instrumentos utilizados en las mediciones en línea para los cálculos del balance de componentes del gas. También se muestran ubicaciones alternativas para el uso opcional de un suministro de oxígeno puro.

La Figura 2 muestra la ruta de oxidación ω y su relación con otra ruta metabólica.

50 La Figura 3 muestra un modelo estequiométrico con base en datos de la literatura de etapas en la ruta de oxidación ω , que conduce a la reacción neta utilizada para determinar los parámetros estequiométricos de biooxidación. Tres de las etapas implican oxígeno molecular.

La Figura 4 muestra el transcurso de una biooxidación de ácido oleico comercial hasta ácidos dicarboxílicos, los niveles residuales de glucosa, y los niveles de ácidos grasos residuales. También se muestra la construcción de líneas estequiométricas y líneas de operación para el cosustrato (parte superior) y el sustrato (parte inferior).

5 La Figura 5 ilustra la integración numérica de los datos estequiométricos en línea de la Figura 4 para uso en la verificación de la estequiometría de la reacción y para la estimación de las concentraciones de producto en la mezcla de reacción de biooxidación.

La Figura 6 es un gráfico del oxígeno acumulado consumido por la ruta de oxidación ω en comparación con los ácidos dicarboxílicos producidos a partir de los datos de la Figura 4. La pendiente indicada verificó el coeficiente estequiométrico neto total de oxígeno en la Figura 3.

10 La Figura 7 compara la concentración de los ácidos dicarboxílicos en la mezcla de reacción calculada utilizando los datos de la reacción en línea y los cálculos estequiométricos con un análisis independiente fuera de línea de las muestras por medio de cromatografía de gases.

15 La Figura 8 es un gráfico del oxígeno acumulado consumido por la ruta de oxidación ω en comparación con los ácidos dicarboxílicos producidos por la conversión de alcanos en ácidos dicarboxílicos. Los alcanos requieren dos pasadas a través de la ruta de oxidación ω que requiere tres moles de oxígeno.

La Figura 9 muestra el transcurso de una biooxidación de ácido oleico comercial hasta ácidos dicarboxílicos.

La Figura 10 muestra el transcurso de una biooxidación de ácido oleico comercial hasta ácidos dicarboxílicos, sin control de la reacción de biooxidación.

Resumen de la invención

20 Un método para controlar una reacción de biooxidación que comprende las etapas de: (1) añadir de forma independiente un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste de un ácido carboxílico o un alcano y un cosustrato en tasas predeterminadas a una mezcla de reacción de biooxidación que cuanta con un biocatalizador que es *Candida Tropicalis* H5343, (2) la medición de la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono de la mezcla de reacción, (3) la determinación de las tasas instantáneas de consumo de sustrato y cosustrato por medio de la resolución de ecuaciones simultáneas en relación con la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono y la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la estequiometría de oxidación del sustrato, la estequiometría de combustión del cosustrato, y, opcionalmente, la estequiometría de formación de la biomasa; (4) ajustar simultáneamente las tasas de adición de sustrato y cosustrato con respecto a las tasas de oxidación del sustrato y de consumo del cosustrato con el fin de maximizar la tasa de formación de producto al mismo tiempo que se reduce al mínimo la tasa de uso del cosustrato.

35 El método de acuerdo con la invención proporciona un medio rápido para controlar reacciones de biooxidación alimentadas por lotes que puede emplear técnicas informáticas y es ampliamente aplicable para diversas reacciones. No hay necesidad de utilizar modelos cinéticos de alta precisión como ha sido el caso con métodos conocidos. Ni tampoco los modelos estequiométricos utilizados para definir el estado de equilibrio de acuerdo con la presente invención tienen que ser muy precisos. Los modelos estequiométricos sólo necesitan ser el reflejo de la reacción de biooxidación para definir el estado de equilibrio predominante, puesto que las tasas de alimentación del sustrato y del cosustrato siguen una línea operativa con respecto a la línea estequiométrica. En contraste con algunos métodos del estado del arte desarrollados para la manipulación de un nutriente limitante para controlar el crecimiento de los microorganismos, el método de acuerdo con la invención no intenta controlar la concentración de sustrato o cosustrato en la reacción de biooxidación, que puede ser inconmensurable por los métodos adecuados para propósitos de control del proceso de rutina.

40 La presente invención proporciona además métodos y ejemplos para la determinación de la estequiometría de reacción necesaria a partir de la literatura o información de la ruta bioquímica cuando esté disponible. A falta de esos datos o cuando exista un conflicto de datos, entonces se proporcionan además métodos y ejemplos para determinar la estequiometría de reacción utilizando experimentos independientes.

50 La presente invención también proporciona un método para determinar la acumulación de producto en la reacción de biooxidación. Se ha encontrado que los métodos de acuerdo con la invención son fáciles de implementar y son suficientemente precisos para eliminar la necesidad de análisis de la muestra fuera de línea durante la biooxidación. También se ha encontrado que los métodos de la presente invención son indispensables en la vigilancia y el mantenimiento de la actividad de biooxidación y reviven o devuelven el control a una reacción de biooxidación después de la alteración de un proceso.

Descripción detallada de la invención

- El término biocatalizador tal como se utiliza en la presente memoria, significa un microorganismo, o una enzima, un sistema enzimático, o una ruta enzimática para una biooxidación *in vivo* suministrado con cualquiera de los cofactores aplicables para biooxidaciones *in vitro* o biooxidaciones en organismos completos no recuperables en forma viable por los medios tradicionales conocidos en el arte para la evaluación de la viabilidad.
- Aunque el método de acuerdo con la invención se puede utilizar preferentemente para el control de la biooxidación de sustratos orgánicos hasta ácidos carboxílicos, puede ser utilizado para la biooxidación de cualquier tipo de sustrato. Tales sustratos incluyen, pero no se limitan a, alcanos, alquenos, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y derivados de ácidos carboxílicos tales como ésteres, amidas, anhídridos y haluros de acilo.
- Una reacción de biooxidación se puede considerar que se compone de tres reacciones simultáneas: (1) la oxidación del sustrato hasta el producto deseado; (2) la combustión del cosustrato para proporcionar energía; (3) los procesos anabólicos de crecimiento para elaborar biomasa a partir del cosustrato. Se ha encontrado que aunque el proceso de Reacción 1 es claramente la reacción de formación del producto deseable, es la Reacción 2 de generación de energía la que es de suma importancia en las reacciones de biooxidación.
- Muchas reacciones de biooxidación se llevó a cabo utilizando de hecho "fase estacionaria" o celdas de "reposo" para las que la velocidad de reacción 3 es cero. Sin embargo, hay muchos ejemplos importantes de reacciones de biooxidación donde el producto se acumula intracelularmente o bien es de crecimiento asociado. En estos casos, se suministra suficiente cosustrato adicional para generar la biomasa necesaria.
- La estequiometría de la reacción establece un sistema de tasas relacionadas a partir de las cuales las velocidades relativas de las reacciones 1 - 3 pueden ser instantáneamente determinadas mediante mediciones de las tasas de captación de oxígeno y de las tasas de producción de dióxido de carbono. Las velocidades de reacción son inmediatamente útiles en el seguimiento del progreso de la biooxidación. Las tasas de reacción individuales se usan entonces para determinar las tasas instantáneas de consumo de sustrato y cosustrato. Las tasas resultantes de consumo de sustrato y de cosustrato se consideran entonces como la definición de un estado de equilibrio o estequiométrico. Las tasas de alimentación de sustrato y de cosustrato siguen entonces una línea de operación en relación con este estado estequiométrico. Se construyen líneas separadas de operación y de equilibrio para la alimentación del sustrato y del cosustrato en la reacción de biooxidación.
- En este sentido, los métodos de esta invención son algo análogos a aquellos comúnmente utilizados para describir, por ejemplo, las operaciones de destilación, extracción con disolvente, y humidificación, donde el progreso de esas operaciones sigue una línea de operación con relación a un estado de equilibrio. De hecho, muchos de los principios y terminología asociados con esas operaciones unitarias pueden ser aplicados aquí. Al igual que en esos ejemplos, la línea de equilibrio es sólo rara vez una línea recta y se ha comprobado que el así definido estado de equilibrio de las reacciones de biooxidación tienen una curvatura considerable, particularmente cuando la actividad de biooxidación es parte de una ruta inducible. Otros efectos que provocan curvatura en la línea de equilibrio incluyen decaimiento de la actividad de oxidación, oxígeno disuelto y otros efectos de limitación de nutrientes, y cambios en las propiedades reológicas del sistema de reacción. Estos efectos pueden ser todos observados y compensados para la utilización de los métodos de esta invención para mantener la reacción de biooxidación a máximo rendimiento.
- En el seguimiento de la reacción de biooxidación, se utiliza convenientemente una construcción gráfica para describir elementos clave de esta invención. Hay muchas formas alternativas de implementar y definir las fórmulas estequiométricas que comprenden la reacción de biooxidación. La estrategia es similar en todos los casos donde se representa la estequiometría de biooxidación como la superposición de la reacción de biooxidación, la combustión de cosustrato productora de energía, y opcionalmente la formación de biomasa. Las tasas de consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono se representan como la suma de sus fuentes a partir de cada reacción con base en la estequiometría de la reacción. Se resuelven las ecuaciones simultáneas resultantes para obtener las tasas de las reacciones individuales en términos del producto o del sustrato seleccionado para definir la tasa de reacción.
- Habiendo determinado las tasas individuales de reacción, a continuación, se determinan las tasas de consumo de sustrato y cosustrato como la suma de sus tasas de consumo para cada reacción. Estas tasas de reacción definen el estado de equilibrio y para una reacción de biooxidación dada seguirán una curva, o línea de equilibrio, durante la duración de la reacción. Si las tasas de alimentación del sustrato y del cosustrato se expresan en los mismos términos que el estado de equilibrio entonces también seguirán una ruta relativa a la línea de equilibrio, usualmente algún múltiplo de la línea de equilibrio. Este múltiplo se llama la pendiente de la línea de operación, la cual puede ser cambiada durante la reacción de biooxidación según sea necesario para mantener la tasa de reacción y generar la composición deseada del caldo final.
- Como convención en la descripción de esta invención, las tasas de formación se toman como positivas. A

continuación, el término para la tasa de producción de dióxido de carbono, o CER es r_{CO_2} y el término para la tasa de consumo de oxígeno, u OUR, es $-r_{O_2}$. La definición de símbolos y ejemplos de unidades usados en esta invención se encuentran en la Tabla 1. Cualquier unidad de medida consistente se puede usar con esta invención.

- 5 Hay muchas maneras de lograr la creación del sistema de tasas relacionado con la biooxidación. De acuerdo con el punto de vista general descrito anteriormente, la reacción biooxidación es la suma de las tres reacciones que tienen un componente de biooxidación, un componente de generación de energía, y un componente de formación de biomasa. Se ha encontrado que es conveniente descomponer la reacción total en esta forma porque hace que los datos informáticos generados mediante el uso de los métodos de esta invención sean física y fisiológicamente relevantes. Esto es ventajoso cuando se trata de alteraciones en el proceso.
- 10 La estequiometría general del componente de biooxidación puede ser representado de acuerdo a la Reacción 1 donde se oxida un sustrato o una mezcla de sustratos hasta unos productos. Una porción del cosustrato también se puede consumida en la modificación del sustrato en su forma de producto final. La Reacción 1 es por lo tanto el resultado neto de múltiples reacciones asociadas con la síntesis de los productos que tienen una tasa r_{1a} .

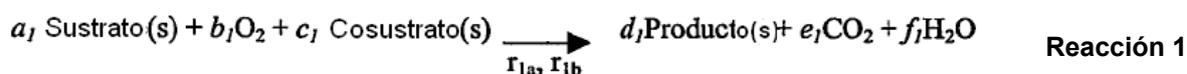


Tabla 1. Definición de variables matemáticas y símbolos

Símbolo	Ejemplos de unidades	Definición
A_1	sin dimensiones	Relación de alimentación del sustrato con respecto a la demanda de sustrato, pendiente de la línea de operación del sustrato
A_2	sin dimensiones	Relación de alimentación del sustrato con respecto a la demanda de sustrato, pendiente de la línea de operación del sustrato
A_3	sin dimensiones	Relación de alimentación del sustrato con respecto a la demanda de sustrato, pendiente de la línea de operación del sustrato
A_4	sin dimensiones	Relación de alimentación del sustrato con respecto a la demanda de sustrato, pendiente de la línea de operación del sustrato
F_s		Tasa real de alimento de sustrato
F_s (punto de referencia)	g/h	punto de referencia de la tasa de alimentación del sustrato
F_c (punto de referencia)	g/h	punto de referencia de la tasa de alimentación del cosustrato
$-r_1$	mgmol de sustrato/kg/h	Tasa de consumo del sustrato por parte de la Reacción 1
$-r_{1a}$	mgmol de O_2 /kg/hora	Tasa de consumo de oxígeno por parte de la Reacción 1 (Ejemplo 11)
$-r_{1a}$ (teórico)	mgmol de O_2 /kg/hora	Tasa de alimentación del sustrato F_s expresada como la tasa de consumo de oxígeno (Ejemplo 11)

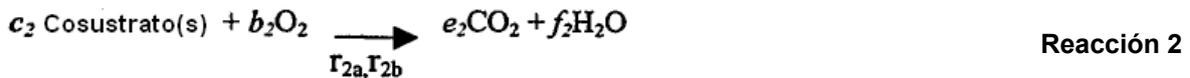
(continuación)

Tabla 1. Definición de variables matemáticas y símbolos		
Símbolo	Ejemplos de unidades	Definición
$-r_2$	mgmol de cosustrato/kg/h	Tasa de consumo del cosustrato por parte de la Reacción 2
r_{2a}	mgmol de CO ₂ /kg/hora	Tasa de producción de dióxido de carbono por parte de la Reacción 2 (Ejemplo 11)
r_{2a} (teórico)	mgmol de CO ₂ /kg/hora	Tasa de alimentación del cosustrato F_C expresada como la tasa de producción de dióxido de carbono
r_3	mgmol de biomasa/kg/h	Tasa de formación de biomasa
r_4	mgmol de biomasa/kg/h	Tasa de formación de biomasa
$-r_5$	mgmol de cosustrato/kg/h	Tasa de consumo de cosustrato por parte de la reacción 5
r_{CO_2}	mgmol de CO ₂ /kg/hora	Tasa de producción de dióxido de carbono; CER
$-r_{O_2}$	mgmol de O ₂ /kg/hora	Tasa de consumo de oxígeno; OUR
$-r_C$	mgmol de cosustrato/kg/h	Tasa de consumo del cosustrato
$-r_S$	mgmol de sustrato/kg/h	Tasa de consumo del sustrato
P_{H_2O}	mgmol de agua/kg/h	Tasa de formación de agua
$M(t)$	kg	Masa real de la mezcla de reacción en función del tiempo (Ejemplo 15)
$Y_{P/X}$	g de Producto/g de Biomasa	Masa del producto en una masa unitaria de biomasa seca
Mw_c	g/gmol	peso fórmula del cosustrato
Mw_P	g/gmol	peso fórmula de producto
Mw_X	g/gmol	peso fórmula de biomasa
Mw_S	g/gmol	peso fórmula de sustrato
$MW_{diácidos}$	g/gmol	peso fórmula de diácidos (Ejemplo 15)
X_c	g/g	Sustancias metabolizables de la fracción de masa en el cosustrato alimentado
X_S	g/g	Sustancias metabolizables de la fracción de masa en el cosustrato alimentado
$X_{diácidos}$	g/kg	Concentración de diácido en el caldo de fermentación (Ejemplo 15)

(continuación)

Tabla 1. Definición de variables matemáticas y símbolos		
Símbolo	Ejemplos de unidades	Definición
V_f	kg	Masa de la reacción de biooxidación
a_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico del sustrato en la reacción i
b_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico del oxígeno en la reacción i
c_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico del cosustrato en la reacción i
d_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico de los productos en la reacción i
e_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico del dióxido de carbono en la reacción i
f_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico del agua en la reacción i
g_j	sin dimensiones	Coefficiente estequiométrico de la biomasa en la reacción i
ψ		Términos recolectados en la ecuación 5 definidos por la ecuación 6
t	horas	tiempo

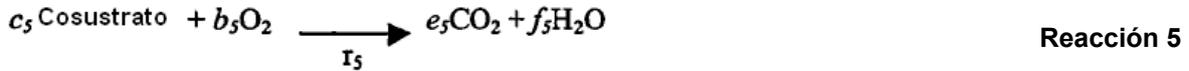
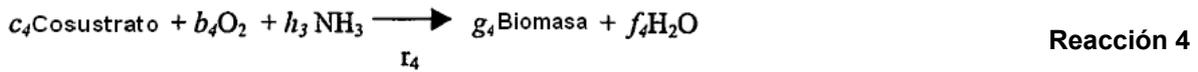
5 Una segunda reacción simultánea se refiere a la generación de energía para mantener las células y conducir la reacción de biooxidación. Esta es la estequiometría de combustión del cosustrato que tiene una tasa r_{2a} .



La Reacción 3 está asociada con la formación de biomasa importante en la preparación de productos de biooxidación asociados con el crecimiento.



10 Con respecto a la Reacción 3 de formación de biomasa, se ha encontrado que es útil subdividir aún más esta reacción en sus partes componentes, en el sentido de sus reacciones catabólicas netas y sus reacciones anabólicas netas. Restando una reacción estequiométrica con base ya sea en el oxígeno o en el dióxido de carbono que representa la combustión del cosustrato se elimina ya sea el oxígeno o el dióxido de carbono de la reacción de formación de la biomasa. Aquí, restando el dióxido de carbono estequiométrico, la cantidad de cosustrato dedicado a la formación de la biomasa está dado por la Reacción 4, y el componente energético de crecimiento está dado por la
15 Reacción 5.



5 La Reacción 2 y la Reacción 5 son las mismas reacciones de generación de energía. No es necesario en la utilización de esta invención distinguir cómo la célula utiliza la energía. Sólo es importante proporcionar cosustrato suficiente para la formación de biomasa, si es necesario, y tener en cuenta la producción neta o el consumo de oxígeno o dióxido de carbono. También es importante tener en cuenta con respecto a la Reacción 4 que el coeficiente estequiométrico de oxígeno puede tener un valor positivo o negativo dependiendo de la naturaleza del cosustrato. Los coeficientes estequiométricos se determinan utilizando la información de la literatura, el conocimiento de la ruta fisiológica, o se determinan por medio de experimentos independientes.

10 Una vez definida la reacción biooxidación de acuerdo con sus Reacciones simultáneas principales 1, 2 y 4, ahora es posible derivar las fórmulas de la tasa de reacción en términos de los balances del componente gaseoso. El balance de oxígeno está dado entonces por la Ecuación 1.

$$-r_{\text{O}_2} = \text{OUR} = (b_4/g_4)r_{4a} - (b_1/a_1)r_{1a} - (b_2/c_2)r_{2a} \quad \text{Ecuación 1}$$

Del mismo modo, el balance de dióxido de carbono está dado por la Ecuación 2.

$$r_{\text{CO}_2} = \text{CER} = (e_1/a_1)(-r_{1a}) - (e_2/c_2)r_{2a} \quad \text{Ecuación 2}$$

15 Para los productos de crecimiento asociados, entonces se busca una cierta tasa de generación de biomasa con relación al producto. Especialmente para productos intracelulares, se dice que la biomasa contiene una cierta fracción de masa del producto como una parte del total. Para esa fracción de la biomasa que necesita ser generada durante la reacción de biooxidación, entonces

$$Y_{p/X} (Mw_X/Mw_p) = \frac{(d_1/a_1) Mw_p (-r_{1a})}{r_{4a} Mw_X + (d_1/a_1) Mw_p (-r_{1a})} \quad \text{Ecuación 3}$$

Las Ecuaciones 1 - 2 constituyen un sistema de ecuaciones con 2 incógnitas para resolver en forma simultánea, usando la ecuación constitutiva 3, para las tasas de cada componente de la reacción que comprenden la biooxidación. Entonces resolviendo primero la tasa de la reacción 2 usando la ecuación 2 se obtiene la Ecuación 4

$$-r_{2a} = (c_2/e_2)[r_{\text{CO}_2} - (e_1/a_1)(-r_{1a})]. \quad \text{Ecuación 4}$$

Resolviendo la tasa de Reacción 4 utilizando la ecuación 3 se obtiene

$$r_{4a} = (d_1/a_1) \Psi (-r_{1a}) \quad \text{Ecuación 5}$$

20 donde,

$$\Psi = (Mw_p/Mw_X) (1/Y_{p/X}) [1 - Y_{p/X}] \quad \text{Ecuación 6}$$

Finalmente resolviendo la Ecuación 1 para la tasa de Reacción 1 usando las ecuaciones 4 a 6 se obtiene

$$-r_{1a} = \frac{-r_{\text{O}_2} - (b_2/e_2)r_{\text{CO}_2}}{(b_1/a_1) - (b_2/e_2)(e_1/a_1) + (b_4/g_4)(d_1/a_1) \Psi} \quad \text{Ecuación 7}$$

Teniendo los valores del balance de componentes gaseosos en línea de CER y OUR, entonces se pueden determinar en forma explícita las tasas de las reacciones individuales usando primero la ecuación 7, luego las ecuaciones 4 y 5. Luego se puede determinar la tasa de utilización del sustrato y cosustrato, que define un estado

de equilibrio de la reacción como el dado por las ecuaciones 8 y 9, respectivamente.

$$-r_s = -r_{1a} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$-r_c = (c_d/g_d)r_{4a} - (c_l/a_l)r_{1a} - r_{2a} \quad \text{Ecuación 9}$$

Los gráficos de $-r_s$ y $-r_c$ versus el tiempo durante el transcurso de la fermentación resulta en el equilibrio anteriormente descrito o en líneas estequiométricas para el sustrato y el cosustrato respectivamente.

5 La tasa de alimentación de sustrato se determina entonces a partir de la línea de operación del sustrato de acuerdo con la ecuación 10.

$$F_s = 0.001 A_1 (Mw_s / X_s) (-r_s) V_f \quad \text{Ecuación 10}$$

10 Un gráfico de $F_s X_s Mw_s / V_f$ versus el tiempo define la línea de operación para el sustrato. En principio, si se selecciona un valor de 1,0 para la pendiente de la línea de operación, entonces la tasa de adición del sustrato será igual a la tasa de consumo del sustrato. En la práctica se ha encontrado que es beneficioso operar biooxidaciones ya sea con los valores de la pendiente de la línea de operación por encima o por debajo de 1,0 dependiendo de en qué fase de la reacción de biooxidación. Esto es particularmente cierto cuando la reacción de biooxidación es parte de una ruta inducible y especialmente cuando el sustrato es el inductor.

15 La Ecuación 10 es adecuada para ser usada en la definición de un punto de referencia para controlar la tasa de alimentación de sustrato en un sistema automatizado. Se han obtenido resultados satisfactorios haciendo ajustes manuales periódicos de la tasa de alimentación del sustrato para mantener la línea de operación deseada con relación a la línea de equilibrio.

Del mismo modo, se determina entonces la tasa de alimentación del cosustrato a partir de la línea de operación del cosustrato de acuerdo con la ecuación 11.

$$F_c = 0.001 A_2 (Mw_c / X_c) (-r_c) V_f \quad \text{Ecuación 11}$$

20 Un gráfico de $F_c X_c Mw_c / V_f$ versus el tiempo define la línea de operación para el cosustrato. En principio, si se selecciona un valor de 1,0 para la pendiente de la línea de operación, entonces la tasa de adición de cosustrato será igual a la tasa de consumo del sustrato. En la práctica se ha encontrado que es beneficioso operar las biooxidaciones ya sea con valores de la pendiente de la línea de operación por encima o por debajo de 1,0 dependiendo de en qué fase de la reacción de biooxidación. Esto es particularmente cierto cuando la reacción de biooxidación es parte de una ruta inducible y especialmente cuando el sustrato es el inductor. La operación de la biooxidación con los valores de la pendiente de la línea operando a menos de 1,0 puede aumentar la velocidad de la Reacción 1 y ahorrar cosustrato, pero normalmente a costa de la longevidad del biocatalizador.

La Ecuación 11 es adecuada para ser usada en la definición de un punto de referencia para controlar la tasa de alimentación del cosustrato en un sistema automatizado. Se han obtenido resultados satisfactorios utilizando control manual haciendo ajustes periódicos de la tasa de alimentación del sustrato para mantener la línea de operación deseada con relación a la línea de equilibrio.

30 Del mismo modo, se determina entonces la tasa de alimentación del cosustrato a partir de la línea de operación del cosustrato acuerdo con la ecuación 11.

35 Este caso general de estrategia de control del proceso de reacción de biooxidación tiene una amplia utilidad en el control de las reacciones de biooxidación. Es muy adecuado para su implementación en instalaciones controladas por ordenador con un sistema de control flexible capaz de ejecutar la estrategia. Se ha encontrado un enfoque alternativo que puede ser ejecutado inmediatamente en instalaciones de laboratorio y de propósito múltiple que tienen la capacidad de proporcionar datos del balance de los componentes del gas sin la necesidad de una reprogramación sustancial en la instalación. Es evidente que muchas expresiones alternativas de la línea de operación y la línea de equilibrio son posibles por medio de la elección de definiciones alternativas de las tasas de reacción individuales y la subdivisión de las reacciones de los componentes de la biooxidación.

40 El Método 1 tiene la ventaja de que las tasas de reacción se expresan directamente en términos del consumo de sustrato y de cosustrato. Se trata de un tratamiento más exacto y es el método preferido aplicable a una amplia gama de biooxidaciones. Un método alternativo que produce resultados adecuados se presenta como el Ejemplo 11 para los que deseen probar inmediatamente esta invención.

Las tasas de reacción r_i habitualmente se expresan en función del peso o del volumen, por ejemplo mgmoles/kg/hora o mgmoles/litro/hora. Se ha encontrado que es algo difícil de manejar e innecesario en la práctica utilizar éstas directamente como expresiones para las líneas de operación y de equilibrio. El sustrato y el cosustrato se alimentan a la mezcla de reacción de biooxidación completa, no sólo un kg o un litro a la vez. Sin embargo, puesto que es deseable controlar la alimentación del sustrato y del cosustrato a la reacción de biooxidación, se espera que la masa o el volumen de la mezcla de reacción puedan cambiar considerablemente durante el transcurso de la reacción. Se ha encontrado por lo tanto que es útil expresar las tasas de reacción en términos del producto $r_i \cdot V_f$ que luego emite las tasas de formación en términos de mgmoles/h para la mezcla de biooxidación completa. Se prefiere entonces modificar la línea de operación, la línea estequiométrica, y las fórmulas de las tasas de alimentación multiplicando ambos lados de la fórmula por V_f . Otra ventaja de esta expresión alternativa para las tasas de reacción es que el reactor de biooxidación no necesita estar equipado con un dispositivo de medición que proporcione mediciones instantáneas de la masa o el volumen de reacción con el fin de hacer uso de esta invención.

En las instalaciones que utilizan las expresiones habituales para que las tasas de reacción expresen r_{CO_2} y $-r_{O_2}$, se puede ingresar entonces un valor de 1 kg o de 1 litro para que el volumen de reacción definido por el usuario suministre estas tasas de reacción en mgmoles/h. Alternativamente, a la preferencia del usuario, se puede ingresar un valor de 1000 para obtener gmoles/h; un valor de 454.000 da lbmoles/h, un valor de 1.000.000 da kgmoles/h. Este método hace una comparación de las reacciones de biooxidación similares realizadas a diferentes escalas de operación difíciles de comparar. En este caso, se ha determinado que es útil modificar aún más la expresión de la tasa dividiendo por una cantidad V^o , que es una masa o volumen estándar que caracteriza la escala del lote. Las velocidades de reacción se expresan entonces en términos del producto $r_i \cdot V_f / V^o$. Esto vuelve ahora la expresión de la tasa a las unidades más usuales. En principio, una buena escogencia para V^o es la masa del biocatalizador cargada a la mezcla de reacción de biooxidación. En la práctica, en la medida en que la carga relativa de biocatalizador sea similar de un lote a otro, entonces se puede escoger una masa o volumen característico de reacción. Los valores típicos pueden ser la masa de partida usada para preparar el biocatalizador, la masa de la mezcla de reacción antes del inicio de la biooxidación, o la suma total de todos los reactivos anticipada para ser cargada al lote. Para las reacciones de biooxidación integradas con una fase de crecimiento que genera el biocatalizador, se ha encontrado que la elección de V^o como la masa inicial del medio de producción cargado al reactor es suficiente para comparar diferentes escalas de operación que abarcan $0,01 \text{ m}^3$ a $> 100 \text{ m}^3$. Esta expresión alternativa tiene la ventaja de producir resultados comparables e inmediatamente reconocibles cuando se lleva a cabo la misma reacción en instalaciones que tienen reactores de diferentes tamaños.

Es digno de mención que el agua de reacción no entra en la línea estequiométrica, en la línea operativa, o en fórmulas de control. Esas fórmulas sólo dependen de las relaciones estequiométricas entre sustrato, cosustrato, biomasa, oxígeno y dióxido de carbono. En efecto, esto es cierto, por ejemplo, si los productos de combustión parciales se forman a partir del cosustrato, o si una porción del sustrato se escinde para liberar un coproducto sin metabolizar. Las estrategias de control presentadas aquí siguen siendo válidas, pero como el agua de reacción, esta se acumula en la mezcla de reacción.

Las reacciones de biooxidación llevadas a cabo en medios acuosos ya tiene agua en gran exceso, pero el agua de la reacción sigue siendo importante en el balance total de materiales de la reacción. El agua de reacción tiene una importancia adicional, por ejemplo, para las reacciones de biooxidación realizadas en sistemas no acuosos. Es entonces útil controlar la velocidad de formación de agua, que se puede calcular sobre la base de las fórmulas de reacción sujetas a las relaciones estequiométricas relacionadas.

$$r_{H_2O} = (f_1/a_1) r_{1a} + (f_2/c_2) r_{2a} + (f_4/g_4) r_{4a}$$

Ecuación 20

Las áreas bajo las líneas estequiométricas durante un intervalo de tiempo darán la producción acumulada del componente de reacción durante ese intervalo de tiempo de reacción. La aplicación de la estequiometría de reacción proporciona entonces la producción acumulada de los otros componentes de la reacción y la adición acumulada de la alimentación. Los datos discretos se integran numéricamente para resolver la integral necesaria. Se ha encontrado que usando la regla del trapecoide se producen resultados satisfactorios. Este principio es actualmente útil para determinar la estequiometría de una reacción de biooxidación cuando no se conoce la estequiometría o existe incertidumbre en los datos estequiométricos disponibles en la literatura. Se ha encontrado además que, si una medición de la masa de reacción se encuentra disponible, entonces se puede determinar la concentración del producto por medio de integración desde el inicio de la reacción de biooxidación hasta cualquier punto durante la reacción. Esto reduce sustancialmente la cantidad de análisis de la muestra fuera de línea necesarios para controlar la reacción de biooxidación.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no limitar la invención.

Ejemplo 1

Cálculos del balance de los componentes gaseosos con adición opcional de oxígeno

5 El objetivo de este ejemplo es proporcionar las expresiones para $r_{CO_2} \cdot V_f$ y $-r_{O_2} \cdot V_f$ en términos de los parámetros de fermentación fácilmente medibles para su uso en las estrategias de control de la presente invención. Las fórmulas matemáticas ejecutadas en la determinación de la tasa de producción de dióxido de carbono y la tasa de consumo de oxígeno para uso en los métodos de esta invención se derivan actualmente de los balances de los componentes de la fase gaseosa. Un diagrama de flujo simplificado del sistema de flujo de gas del reactor de biooxidación para su uso en la definición de los cálculos del balance de los componentes gaseosos se muestra en la Figura 1, donde se burbujea un gas que contiene oxígeno, normalmente aire, en la mezcla de reacción. Opcionalmente, un suministro adicional de oxígeno puede mezclarse con el aire para enriquecer su contenido de oxígeno o burbujearlo directamente en el reactor de biooxidación. Las ecuaciones del balance de los componentes gaseosos son válidas y algebraicamente las mismas con independencia de la ubicación de la alimentación escogida ya sea para el suministro opcional de aire o de oxígeno. Los gases combinados en contacto con la mezcla de reacción se empobrecen algo en oxígeno y se enriquecen en dióxido de carbono y humedad luego de salir del reactor de biooxidación. Una definición de nombres de variables y de símbolos utilizados en las fórmulas de balance de gases se da en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Definición de las variables matemáticas y símbolos utilizados en los cálculos del balance de los componentes gaseosos.		
Símbolo	Ejemplos de unidades	Definición
F_{aire}	mgmoles/min	Velocidad de flujo molar del aire a la reacción de biooxidación
F_{O_2}	mgmoles/min	Velocidad de flujo molar de oxígeno puro opcional a la reacción de biooxidación
F_{salida}	mgmoles/min	Velocidad de flujo molar del gas que sale de la reacción de biooxidación
K	sin dimensiones	Factor de corrección para la medición del gas para un instrumento calibrado con un gas diferente al gas medido
P°	atm	Presión estándar usada por el instrumento para la medición del gas
R	atm litros/gmol K	Constante de la ley de gases
r_{CO_2}	mgmol de CO_2 /kg/hora	Tasa de producción de dióxido de carbono; CER
$-r_{O_2}$	mgmol O_2 /kg/hora	Tasa de consumo de oxígeno; OUR
T°	K	Temperatura estándar usada por el instrumento para la medición del gas
V_{aire}	litros estándar /min	Velocidad de flujo volumétrico del aire en condiciones estándar
V_{O_2}	litros estándar /min	Velocidad de flujo volumétrico del oxígeno en condiciones estándar
V_f	kg	Masa de reacción de la biooxidación
X_{N_2aire}	mol/mol	Fracción en moles de nitrógeno en el compresor de aire

(continuación)

Tabla 1.1. Definición de las variables matemáticas y símbolos utilizados en los cálculos del balance de los componentes gaseosos.		
Símbolo	Ejemplos de unidades	Definición
$X_{N2salida}$	mol/mol	Fracción en moles de nitrógeno en los gases de salida de la biooxidación
X_{O2aire}	mol/mol	Fracción en moles de oxígeno en el compresor de aire
$X_{O2salida}$	mol/mol	Fracción en moles de oxígeno en los gases de salida de la biooxidación
$X_{CO2aire}$	mol/mol	Fracción en moles de dióxido de carbono en el compresor de aire
$X_{CO2salida}$	mol/mol	Fracción en moles de dióxido de carbono en los gases de salida de la biooxidación

- 5 Bajo condiciones de flujo estacionario, la acumulación de nitrógeno, dióxido de carbono y oxígeno en la mezcla de reacción se consideran insignificantes. Las reacciones del dióxido de carbono con bicarbonatos o carbonatos son también insignificantes en el balance de dióxido de carbono, excepto en condiciones extremadamente alcalinas (pH > 8,5). Se supone que el nitrógeno no reacciona en la reacción de biooxidación y se utiliza como un componente de enlace para vincular la medición del flujo de gas en la entrada con el flujo de gas a la salida. Un componente alternativo de enlace es el argón. Este uso del componente de enlace elimina la necesidad de una medición de flujo independiente en la salida. Los balances de los componentes gaseosos para el nitrógeno, el oxígeno y el dióxido de carbono se expresan por medio de
- 10

$$F_{aire}(X_{N2aire}) + F_{O2}(0) - F_{salida}(X_{N2salida}) = 0 \quad \text{Ecuación 1.1}$$

$$F_{aire}(X_{O2aire}) + F_{O2}(1) - F_{salida}(X_{O2salida}) + r_{O2} V_f = 0 \quad \text{Ecuación 1.2}$$

$$F_{entrada}(X_{CO2aire}) + F_{O2}(0) - F_{salida}(X_{CO2salida}) + r_{CO2} V_f = 0 \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Es claro entonces que la velocidad de flujo del gas a la salida está relacionada con la velocidad de flujo del gas en la entrada por medio del nitrógeno como componente de enlace utilizando la Ecuación 1.1 por

$$F_{salida} = F_{aire}(X_{N2aire}/X_{N2salida}) \quad \text{Ecuación 1.4}$$

- 15 Las mediciones de las velocidades de flujo de los gases no se expresan normalmente en velocidades de flujo molar, sino que se miden típicamente en términos volumétricos. La velocidad molar de flujo de gas está entonces relacionada con la velocidad de flujo volumétrico de acuerdo con una ecuación de estado. Bajo la mayoría de las condiciones de flujo de las reacciones de biooxidación, la ley de los gases ideales debe ser suficiente para el propósito del cálculo del balance de los componentes del gas. Ecuaciones alternativas de estado incluyen, por ejemplo, la ecuación de Van der Waals o la ecuación de Redlich-Kwong. Entonces la ley de gases ideales proporciona la velocidad de flujo molar del aire y del oxígeno suplementario que ingresan en el reactor de biooxidación
- 20

$$F_{\text{aire}} = \left(\frac{K P^{\circ}}{R T^{\circ}} \right) V_{\text{aire}} \text{ flujómetro de aire} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

$$F_{\text{O}_2} = \left(\frac{K P^{\circ}}{R T^{\circ}} \right) V_{\text{O}_2} \text{ flujómetro de O}_2 \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Debe entenderse que los términos T° y P° se evalúan en las condiciones de flujo de la medición de V . Si la medición de V se reporta como una velocidad de flujo volumétrico estándar, entonces los términos T° y P° son las condiciones de referencia estándar del dispositivo de medición. El término K es una corrección aplicada cuando el dispositivo de medición se calibra con una composición de gas diferente del gas que se mide en la reacción de biooxidación.

5 Sustituyendo las Ecuaciones 1.4, 1.5 y 1.6 en la Ecuación 1.2 se obtiene la tasa de consumo de oxígeno

$$-r_{\text{O}_2} \cdot V_f = \left(\frac{K P^{\circ}}{R T^{\circ}} \right) V_{\text{O}_2} + \left(\frac{K P^{\circ}}{R T^{\circ}} \right) V_{\text{aire}} [X_{\text{O}_2\text{aire}} - X_{\text{O}_2\text{salida}} (X_{\text{N}_2\text{aire}} / X_{\text{N}_2\text{salida}})] \quad \text{Ecuación 1.7}$$

En forma similar, sustituyendo las Ecuaciones 1.4 y 1.5 en la Ecuación 1.3 se obtiene la tasa de producción de dióxido de carbono.

$$r_{\text{CO}_2} \cdot V_f = \left(\frac{K P^{\circ}}{R T^{\circ}} \right) V_{\text{aire}} [X_{\text{CO}_2\text{salida}} (X_{\text{N}_2\text{aire}} / X_{\text{N}_2\text{salida}}) - X_{\text{CO}_2\text{aire}}] \quad \text{Ecuación 1.8}$$

Estas Ecuaciones 1.7 y 1.8 juntas son variables intermedias derivadas útiles, usadas en la realización de los métodos de esta invención. Si no se utiliza oxígeno adicional entonces el término $V_{\text{O}_2} = 0$ en la Ecuación 1.7.

10 Ejemplo 2

Dispositivos para la medición de los balances de los componentes gaseosos

Las mediciones de flujo de gas se pueden hacer utilizando cualquiera de una serie de dispositivos de flujo de gas que generan una señal análoga o digital calibrada que representa la tasa de flujo de gas. Estos incluyen medidores de flujo másico térmicos, medidores de placa de orificios y medidores de efecto Coriolis. Estos instrumentos suelen expresar mediciones de flujo de gas en unidades volumétricas estándar, que es la tasa volumétrica a una cierta temperatura y presión estándares. Estos son la norma T° y P° estándar que se utilizan en el método del Ejemplo 1. El proveedor de instrumentos también puede suministrar el valor para K si el instrumento de flujo de gas se usa con un gas distinto del gas de calibración.

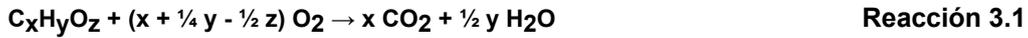
Se puede utilizar una variedad de instrumentos para análisis de la composición del gas en el método del Ejemplo 1. En dicho método, un suministro de aire común puede servir múltiples reactores de biooxidación, es más útil para muestrear el suministro de aire del compresor y las biooxidaciones en una secuencia de repetición hacia un instrumento común. Los espectrómetros de masas son los dispositivos de medición preferidos por su capacidad para determinar en forma simultánea la fracción molar o volumétrica de los componentes del gas en un barrido de la muestra de gas, y por otras razones como se describió anteriormente (Coppella y Dhurjati, 1987). Se logró un rendimiento satisfactorio utilizando espectrómetros de masas de sector fijo y variable.

Ejemplo 3

Parámetros estequiométricos y de operación para la combustión de cosustratos puros

Este ejemplo se refiere a la determinación de los coeficientes estequiométricos de la Reacción 2 para la combustión de alimentaciones de cosustrato puro ($X_c = 1$). Estos coeficientes se utilizan luego directamente en las fórmulas de seguimiento y control de la presente invención.

5 La Reacción 2 representa la red de una serie de reacciones bioquímicas por medio de las cuales se genera energía a partir del cosustrato por parte del biocatalizador. No es necesario que la ruta sea conocida para la determinación de los coeficientes estequiométricos apropiados de la Reacción 2, ya que la estequiometría es la misma para la combustión completa del mismo cosustrato en presencia de oxígeno que de dióxido de carbono y agua. Es decir, para un cosustrato de fórmula química $C_xH_yO_z$, entonces la estequiometría de combustión viene dada por



Por inspección con la Reacción 2 de la memoria descriptiva, entonces

$$c_2 = 1 \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$b_2 = (x + \frac{1}{4}y - \frac{1}{2}z) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$e_2 = x \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$f_2 = \frac{1}{2}y \quad \text{Ecuación 3.4}$$

También es claro que

$$Mw_C = 12.011x + 1.008y + 15.999z \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Adicionalmente, para el uso de un cosustrato del componente puro entonces

$$10 \quad X_C = 1 \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Estas relaciones, Ecuaciones 3.1 – 3.6, definen ciertos parámetros estequiométricos y de la línea de operación utilizados en la estrategia de seguimiento y control de acuerdo con la invención. Han sido aplicados a una cantidad de ejemplares de cosustratos puros que se pueden utilizar con los métodos de esta invención como se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Ejemplo de cosustratos de biooxidación y de parámetros relacionados con la reacción 2 de combustión del cosustrato.							
Parámetro ¹	Parámetros de la línea de operación			Parámetros estequiométricos			
	Mw _C	X _C	(Mw _C /X _C)	C ₂	b ₂	e ₂	f ₂
Cosustrato							
Ácidos orgánicos							
Ácido fórmico	46,03	1,0	46,03	1	0,5	1	1
Ácido acético	60,05	1,0	60,05	1	2	2	2
Ácido propiónico	74,08	1,0	74,08	1	3,5	3	3

ES 2 395 010 T3

(continuación)

Tabla 3.1. Ejemplo de cosustratos de biooxidación y de parámetros relacionados con la reacción 2 de combustión del cosustrato.							
	Parámetros de la línea de operación			Parámetros estequiométricos			
Ácido láctico	90,08	1,0	90,08	1	3	3	3
Ácido láurico	200,31	1,0	200,31	1	17	12	12
Ácido mirístico	228,36	1,0	228,36	1	20	14	14
Ácido miristoleico	226,36	1,0	226,36	1	19,5	14	13
Ácido palmítico	256,42	1,0	256,42	1	23	16	16
Ácido palmitoleico	254,41	1,0	254,41	1	22,5	16	15
Ácido margárico	270,45	1,0	270,45	1	24,5	17	17
Ácido esteárico	284,47	1,0	284,47	1	26	18	18
Ácido oleico	282,45	1,0	282,45	1	25,5	18	17
Ácido linoleico	280,44	1,0	280,44	1	25	18	16
Ácido linolénico	278,43	1,0	278,43	1	24,5	18	15
Alcoholes							
Metanol	32,04	1,0	32,04	1	1,5	1	2
Etanol	46,07	1,0	46,07	1	3	2	3
Glicerol	92,09	1,0	92,09	1	3,5	3	4
Carbohidratos							
Glucosa	180,16	1,0	180,16	1	6	6	6
Fructosa	180,16	1,0	180,16	1	6	6	6
Maltosa	342,30	1,0	342,30	1	12	12	11
Sacarosa	342,30	1,0	342,30	1	12	12	11
Lactosa	342,30	1,0	342,30	1	12	12	11
Hidrocarburos							
Parámetro ¹	Mw _C	X _C	(Mw _C /X _C)	C ₂	b ₂	e ₂	f ₂
Metano	16,04	1,0	16,04	1	2	1	2
Etano	30,07	1,0	30,07	1	3,5	2	3

(continuación)

Tabla 3.1. Ejemplo de cosustratos de biooxidación y de parámetros relacionados con la reacción 2 de combustión del cosustrato.							
	Parámetros de la línea de operación			Parámetros estequiométricos			
Propano	44,09	1,0	44,09	1	5	3	4
Butano	58,12	1,0	58,12	1	6,5	4	5
Pentano	72,15	1,0	72,15	1	8	5	6
Hexano	86,17	1,0	86,17	1	9,5	6	7
Octano	114,22	1,0	114,22	1	12,5	8	9
Iso-octano	114,22	1,0	114,22	1	12,5	8	9
Decano	142,28	1,0	142,28	1	15,5	10	11
Dodecano	170,33	1,0	170,33	1	18,5	12	13
Tridecano	184,36	1,0	184,36	1	20	13	14
Tetradecano	198,38	1,0	198,38	1	21,5	14	15
Hexadecano	226,43	1,0	226,43	1	24,5	16	17
¹ La definición y los ejemplos de unidades se dan en la Tabla 1.							

Ejemplo 4

5 Parámetros estequiométricos y de operación para la combustión de mezclas de cosustratos

Este ejemplo se refiere a la utilización de cosustrato donde el cosustrato es una mezcla de componentes metabolizados y sin metabolizar.

10 Existe un fuerte incentivo económico para utilizar formas técnica o comercial de productos químicos como cosustratos debido al alto costo y la disponibilidad de compuestos puros. Los cosustratos seleccionados de los productos químicos básicos de las industrias agroquímica y petroquímica incluirán entonces una mezcla de componentes metabolizados y sin metabolizar. También se pueden añadir auxiliares de procesamiento durante la preparación de la última corriente de cosustrato alimentada a la reacción de biooxidación. Estos deben tenerse en cuenta en la determinación de los valores apropiados para los parámetros estequiométricos y de operación de esta invención. Si el cosustrato se compone sólo de sustancias metabolizadas y una fórmula molecular está disponible para la mezcla, entonces es posible utilizar el método del Ejemplo 2 en la determinación de los parámetros estequiométricos y de ciertas operaciones.

15

Si el cosustrato se compone de i componentes, de los cuales j de los componentes se metabolizan, entonces, los parámetros de operación vienen dados por

$$X_C = \sum_j X_{Ci}$$

Ecuación 4.1

y

$$Mw_c = \frac{X_c}{\sum_j (X_{Ci}/Mw_{Ci})} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Para el cálculo de los parámetros estequiométricos, es útil convertir primero las fracciones de masa en fracciones molares de los componentes metabolizables, entonces

$$Z_{Ci} = \frac{(X_{Ci}/Mw_{Ci})}{\sum_j (X_{Ci}/Mw_{Ci})} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

5 A continuación, se determinan cada uno de los parámetros estequiométricos a partir de los parámetros estequiométricos para cada uno de los componentes puros individuales usando los métodos del Ejemplo 3 de acuerdo con

$$c_2 = \sum_j (c_{2i} \cdot Z_{Ci}) \quad \text{Ecuación 4.4}$$

$$b_2 = \sum_j (b_{2i} \cdot Z_{Ci}) \quad \text{Ecuación 4.5}$$

$$e_2 = \sum_j (e_{2i} \cdot Z_{Ci}) \quad \text{Ecuación 4.6}$$

$$f_2 = \sum_j (f_{2i} \cdot Z_{Ci}) \quad \text{Ecuación 4.7}$$

La implementación de estas normas de mezcla se logra fácilmente en un programa de hoja de cálculo.

Ejemplo 5

Preparación de la alimentación del cosustrato de glucosa

10 Se preparó una alimentación de glucosa al 50,5% para uso en un sistema de alimentación no temperado por medio de la disolución de 1497 kg de monohidrato de glucosa en 1198 kg de agua. Se transfirió luego la solución acuosa a un recipiente a presión y se esterilizó por medio de calentamiento indirecto con vapor. Esta alimentación (2695 kg) contenía entonces 1361 kg de glucosa, 136 kg de agua de hidratación, y 1198 kg de agua como disolvente.

15 Las sumas apropiadas de las Ecuaciones 4.1 - 4.7 se calculan para su uso en la determinación de los parámetros estequiométricos y de operación para el uso de esta alimentación como cosustrato, como se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Cálculo de los parámetros estequiométricos y de operación para uso de una alimentación del cosustrato de glucosa preparada a partir de monohidrato de glucosa.								
	Mw _{Ci}	X _{Ci}	X _{Ci} /Mw _{Ci}	Z _{Ci}	c _{2i} ·Z _{Ci}	b _{2i} ·Z _{Ci}	e _{2i} ·Z _{Ci}	f _{2i} ·Z _{Ci}
<i>Componentes metabolizados</i>								
Glucosa	180,16	0,505	0,002803	1	1	6	6	6
Subtotal metabolizado			0,002803	1	1	6	6	6
<i>Componentes no metabolizados</i>								
Agua de hidratación		0,050						
Agua como disolvente		0,445						
Subtotal no metabolizado		0,495						
Total		1,000						
Calculo de Resultados:								
Parámetro de operación		Mw _C	180,16		Ecuación 4.1			
Parámetro de operación		X _C	0,505		Ecuación 4.2			
Parámetro estequiométrico		c ₂	1		Ecuación 4.4			
Parámetro estequiométrico		b ₂	6		Ecuación 4.5			
Parámetro estequiométrico		e ₂	6		Ecuación 4.6			
Parámetro estequiométrico		f ₂	6		Ecuación 4.7			

Ejemplo 6

Preparación de una alimentación de cosustrato de glucosa

- 5 Alternativamente, se preparó una alimentación de cosustrato de glucosa a partir de jarabe de maíz comercial 95DE que contiene 72% de sólidos secos. La fracción de sólidos secos se compone de glucosa que puede ser metabolizada al 96% y los restantes 4% de sólidos se consideraron como no metabolizables. Los envíos a granel de jarabe de maíz 95DE se diluyeron con agua hasta un 55% de sólidos secos para el uso conveniente en un sistema de almacenamiento y distribución no temperado.

5 Se transfirió una alícuota medida de jarabe de maíz diluido a un tanque de almacenamiento para la esterilización y alimentación de una reacción de biooxidación. Antes de utilizar el tanque y el jarabe de maíz diluido fueron esterilizados por medio de calentamiento directo con vapor, que diluye adicionalmente el jarabe de maíz debido a la acumulación de condensado de vapor. El contenido final de sólidos secos de la alimentación de cosustrato resultante fue de 47,1% de sólidos secos. El contenido de sólidos en el jarabe de maíz y las corrientes intermedias en la preparación de este alimento de cosustrato se determinaron convenientemente por medio de la correlación con las mediciones del índice de refracción.

10 Por medio de la resolución simultánea de los balances de materiales de componentes y totales en torno a las operaciones de mezcla y la esterilización, una base de 1000 kg de la alimentación final de cosustrato estéril contenía entonces: 452,2 kg de glucosa, 18,8 kg de otros sólidos, 143,6 kg de condensado de vapor, 202,2 kg del disolvente agua, y 183,2 kg de agua del jarabe de maíz. Las sumas relevantes de las Ecuaciones 4.1 - 4.7 se calculan para uso en la determinación de los parámetros estequiométricos y de operación para la utilización de esta alimentación como cosustrato, como se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Cálculo de los parámetros estequiométricos y de operación para uso de una alimentación de cosustrato de glucosa de jarabe de maíz 95DE.								
	Mw _{Ci}	X _{Ci}	X _{Ci} /Mw _{Ci}	Z _{Ci}	c _{2i} Z _{Ci}	b _{2i} Z _{Ci}	e _{2i} Z _{Ci}	f _{2i} Z _{Ci}
<i>Componentes metabolizados</i>								
Glucosa	180,16	0,452	0,00251	1	1	6	6	6
Subtotal metabolizado		0,452	0,00251		1	6	6	6
<i>Componentes no metabolizados</i>								
Agua del jarabe de maíz		0,183						
Agua de disolución		0,202						
Otros sólidos de jarabe de maíz		0,019						
Condensado de vapor		0,144						
Subtotal no metabolizado		0,548						
Total		1,000						
Cálculo de resultados								
Parámetro de operación		Mw _C	180,16		Ecuación 4.1			
Parámetro de operación		X _C	0,452		Ecuación 4.2			
Parámetro estequiométrico		c ₂	1		Ecuación 4.4			
Parámetro estequiométrico		b ₂	6		Ecuación 4.5			
Parámetro estequiométrico		e ₂	6		Ecuación 4.6			
Parámetro estequiométrico		f ₂	6		Ecuación 4.7			

15 **Ejemplo 7**

Preparación de una alimentación de cosustrato de azúcar mezclado

ES 2 395 010 T3

Las especificaciones para una dextrosa líquida STALEYDEX® 95 M muestran que contiene 71% - 72% de sustancia seca de los cuales un 95% (min.) es de monosacáridos, un 86% (min.) es la glucosa y el 9% (max.) es la fructosa. Un análisis por HPLC de la dextrosa líquida STALEYDEX® 95 M confirmó su contenido de glucosa era de 61,3% de glucosa. La fructosa, tomada como 9% de la materia seca, se encontró que era metabolizada de manera similar en paralelo con la glucosa en una reacción de biooxidación. La fructosa estaba incluida por lo tanto como un componente metabolizado.

Se preparó un alimento de cosustrato de azúcar mezclado para contener 50% de glucosa mezclando 2,26 kg de agua desionizada para 10 kg de dextrosa líquida STALEYDEX® 95 M. La dilución se hizo por la facilidad de manejo en un sistema de biooxidación de laboratorio no temperado. Esta solución final de cosustrato (12,26 kg) incluía entonces 6,13 kg de glucosa, 0,635 kg de fructosa, 0,285 kg de otros sólidos, 2,95 kg de agua de la dextrosa líquida, y 2,26 kg de agua de dilución. Se distribuyó la mezcla en frascos para conservas, se sellaron de acuerdo con la recomendación de los fabricantes, a continuación fueron autoclavados en un autoclave de laboratorio para un uso posterior. La sumas correspondientes de las ecuaciones 4.1 - 4.7 se calculan para su uso en la determinación de los parámetros estequiométricos y de operación para el uso de esta alimentación como cosustrato, como se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Cálculo de los parámetros estequiométricos y de operación para uso de una alimentación de cosustrato de azúcar mezclado preparado a partir de dextrosa líquida STALEYDEX 95M.								
	Mw _{Ci}	X _{Ci}	X _{Ci} /Mw _{Ci}	Z _{Ci}	c _{2i} Z _{Ci}	b _{2i} Z _{Ci}	e _{2i} Z _{Ci}	f _{2i} Z _{Ci}
<i>Componentes metabolizados</i>								
Fructosa	180,16	0,052	2,87E-4	0,906	0,906	5,437	5,437	5,437
Glucosa	<u>180,16</u>	<u>0,500</u>	<u>0,00278</u>	<u>0,094</u>	<u>0,094</u>	<u>0,563</u>	<u>0,563</u>	<u>0,563</u>
Subtotal metabolizado		0,552	0,00251	1	1	6	6	6
<i>Componentes no metabolizados</i>								
Agua de la dextrosa líquida		0,241						
Agua de la dilución		0,184						
Otros sólidos de la dextrosa líquida		0,023						
Subtotal no metabolizado		0,448						
Total		1,000						
Cálculo de resultados								
Parámetro de operación		Mw _C	180,16		Ecuación 4.1			
Parámetro de operación		X _C	0,552		Ecuación 4.2			
Parámetro estequiométrico		c ₂	1		Ecuación 4.4			
Parámetro estequiométrico		b ₂	6		Ecuación 4.5			
Parámetro estequiométrico		e ₂	6		Ecuación 4.6			
Parámetro estequiométrico		f ₂	6		Ecuación 4.7			

Ejemplo 8

Preparación de una alimentación de cosustrato de ácido graso

5 Doscientos gramos de ácido oleico EMERSOL® que tiene una composición típica dada en la Tabla 8.1 se cargaron a un matraz Erlenmeyer. Antes de la esterilización por medio de calentamiento indirecto con vapor, se añadieron 10 gramos de agua destilada para mejorar la efectividad de la esterilización. La esterilización posterior del cosustrato contenía por lo tanto, 95,2% del ácido oleico EMEROL® y 4,8% de agua.

Tabla 8.1. Composición típica del ácido oleico EMERSOL®.

Ácido graso componente	% en peso
Ácido mirístico	3
Ácido miristoleico	3
Ácido palmítico	4
Ácido palmitoleico	7
Ácido margárico	1
Ácido oleico	73
Ácido linoleico	8
Ácido linolénico	1

10 Las sumas relevantes de las Ecuaciones 4.1 – 4.7 se calculan para su uso en la determinación de los parámetros estequiométricos y de operación para la utilización de esta alimentación como cosustrato, como se muestra en la Tabla 8.2. Un enfoque similar se utiliza para muchos de los ácidos grasos del comercio.

Tabla 8.2. Cálculo de los parámetros estequiométricos y de operación para uso de una alimentación de cosustrato de ácido graso mezclado preparado a partir del ácido oleico EMERSOL®

	Mw _{Ci}	X _{Ci}	X _{Ci} /Mw _{Ci}	Z _{Ci}	c _{2i} ·Z _{Ci}	b _{2i} ·Z _{Ci}	e _{2i} ·Z _{Ci}	f _{2i} ·Z _{Ci}
<i>Componentes metabolizados</i>								
Ácido mirístico	228,36	0,029	0,00013	0,036	0,036	0,722	0,506	0,506
Ácido miristoleico	226,36	0,029	0,00013	0,036	0,036	0,710	0,510	0,474
Ácido palmítico	256,42	0,038	0,00015	0,043	0,043	0,986	0,686	0,686
Ácido palmitoleico	254,40	0,067	0,00026	0,076	0,076	1,702	1,210	1,135
Ácido margárico	270,45	0,010	0,00004	0,010	0,010	0,249	0,173	0,173
Ácido oleico	282,45	0,695	0,00246	0,710	0,710	18,117	12,789	12,078
Ácido linoleico	280,44	0,076	0,00027	0,078	0,078	1,960	1,412	1,255

(continuación)

Tabla 8.2. Cálculo de los parámetros estequiométricos y de operación para uso de una alimentación de cosustrato de ácido graso mezclado preparado a partir del ácido oleico EMERSOL®								
	Mw _{Ci}	X _{Ci}	X _{Ci} /Mw _{Ci}	Z _{Ci}	c _{2i} Z _{Ci}	b _{2i} Z _{Ci}	e _{2i} Z _{Ci}	f _{2i} Z _{Ci}
Ácido linolénico	278,43	0,010	0,00003	0,010	0,010	0,242	0,178	0,148
Subtotal metabolizado		0,952	0,00346	1	1	24,69	17,46	16,45
<i>Componentes no metabolizados</i>								
Agua (auxiliar de esterilización)		0,048						
Subtotal no metabolizado		<u>0,448</u>						
Total		1,000						
Cálculo de resultados								
Parámetro de operación		Mw _c	274,9		Ecuación 4.1			
Parámetro de operación		X _c	0,952		Ecuación 4.2			
Parámetro estequiométrico		c ₂	1		Ecuación 4.4			
Parámetro estequiométrico		b ₂	24,69		Ecuación 4.5			
Parámetro estequiométrico		e ₂	17,46		Ecuación 4.6			
Parámetro estequiométrico		f ₂	16,45		Ecuación 4.7			

Ejemplo 9

- 5 Resumen de los enfoques para el establecimiento de los parámetros estequiométricos y de operación para sustratos de biooxidación

10 En contraste con los métodos utilizados para el establecimiento de parámetros estequiométricos y de operación para el cosustrato que se basó en la estequiometría de combustión del cosustrato, la diversidad de sustratos de biooxidación potencial y de productos de biooxidación no se presta de inmediato para tales reglas simples. La ruta tomada para oxidar el sustrato hasta el producto final deseado contiene al menos una etapa que involucra oxígeno molecular, pero también puede contener más de uno. La ruta puede incluir etapas adicionales que no involucran directamente oxígeno molecular.

15 En los casos donde se conoce la ruta desde el sustrato hasta el producto, y se conoce la estequiometría de cada etapa, entonces se puede determinar la estequiometría total de la reacción. Este puede muy bien ser el caso para un biocatalizador deliberadamente creado usando técnicas de ADN recombinante.

En años recientes han habido muchos estudios científicos sobre la enzima y los sistemas enzimáticos que utilizan oxígeno molecular. Puede haber suficiente información disponible en la literatura abierta para una reacción similar de biooxidación para escribir *a priori* la correcta estequiometría total de reacción para la oxidación deseada.

20 La situación más frecuente sin embargo, es que de hecho hay suficiente información disponible en la literatura para escribir al menos una estequiometría plausible, pero existe información contradictoria o falta información que genera

incertidumbre en la estequiometría total de la reacción.

Ejemplo 10

Oxidación de alcanos y ácidos grasos hasta ácidos dicarboxílicos: Determinación de los parámetros estequiométricos del sustrato a partir de datos de la literatura

5 El mecanismo por medio del cual los alcanos entran en las rutas de degradación metabólica se considera en general que se producen a través de la oxidación secuencial de un carbono del metilo terminal: primero hasta un alcohol, luego al aldehído, y, finalmente hasta un ácido carboxílico. Esta ruta de oxidación del carbono del metilo terminal hasta ácido carboxílico se denomina la ruta de oxidación ω . El ácido graso resultante puede entonces entrar a la ruta de oxidación β para una degradación adicional o puede ser la incorporación en el reservorio de los lípidos celulares.

10 Rehm y Reiff (Adv. Biochem. Eng., 9, páginas 175 - 215, 1981) examinaron los diversos mecanismos de oxidación de alcanos en microorganismos. La Figura 2 muestra esquemáticamente la ruta de oxidación ω y su relación con la oxidación β y la incorporación de ácidos grasos.

15 Se ha demostrado en *Candida tropicalis* que, si la ruta de oxidación β se bloquea, entonces los sustratos de alcano y de ácido graso se convierten en sus correspondientes ácidos dicarboxílicos con alta pureza y alto rendimiento (Picataggio et al., Bio / Technology, páginas 894 - 898, 1992 y la patente de los Estados Unidos No. 5.254.466). Así, el carbono del sustrato se dirige a la ruta de oxidación omega para ser excretado de la célula. Los procedimientos de fermentación que involucran el crecimiento de una población de células después alimentaron un cosustrato de glucosa a la tasa prescrita. Se añadió sustrato con base en el muestreo periódico y el análisis fuera de línea para mantener una concentración de sustrato residual en 4 - 60 gramos / litro de caldo de fermentación.

20 Para aplicar los métodos de esta invención al proceso de biooxidación de Picataggio, primero es útil para evaluar lo que se conoce acerca de la estequiometría total de la reacción de oxidación ω , particularmente en levadura, y en particular *Candida tropicalis*. Gallo et al. ("Alkane Oxidation in *Candida tropicalis*", Biochimica et Biophysical Acta, 296, páginas 624 - 638, 1973) confirmaron y extendieron un trabajo previo de que la primera etapa de hidroxilación que depende de NADPH mediada por la monooxigenasa del citocromo P450 de función mixta. Rehm y Reiff (en el lugar citado) produjo la estequiometría de esta reacción de hidroxilación como se muestra en la Figura 3.

25

El primer trabajo de Gallo et al. (en el lugar citado) sugirió que la segunda etapa para oxidar el alcohol hasta un aldehído fue catalizada por una deshidrogenasa dependiente de NAD^+ que no involucra oxígeno molecular. Un trabajo posterior por Kemp et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, págs. 370 - 374, 1988) contradujo ese trabajo y demostró que la reacción fue catalizada por una alcohol oxidasa que implica el consumo de oxígeno y la liberación de peróxido de hidrógeno como se muestra en la Figura 3.

30

El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva que muy poco probablemente se acumula en la célula. Es de destacar que el aldehído y el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar espontáneamente para formar un ácido carboxílico y agua. Más bien, es más probable que la enzima catalasa disponga de esta especie reactiva para producir oxígeno y agua, como se muestra en la Figura 3.

35 Por último, el trabajo tanto de Gallo et al. (en el lugar citado) como de Kemp et al. (en el lugar citado) están de acuerdo en que el último paso es catalizado por una deshidrogenasa que depende de NAD^+ para producir el ácido carboxílico.

40 Un esquema posible de reacción para la oxidación de grupos metilo terminales, especialmente relacionados con la formación de ácido dicarboxílico a partir de alcanos y de ácidos grasos se presenta como la reacción de oxidación ω de la Figura 3. Cuando se aplica a un sustrato de ácido graso, se requiere de una pasada a través de esta reacción que consume 1,5 moles de oxígeno y produciendo una mol de producto. Cuando se aplica a un sustrato de alcano, se requiere de dos pasadas para oxidar cada extremo del alcano hasta un ácido dicarboxílico que consume 3 moles de oxígeno por cada mol de sustrato y de producto.

45 La incertidumbre en la estequiometría surge porque podría existir alguna actividad de la alcohol deshidrogenasa en paralelo con la actividad de la oxidasa. También podría ocurrir alguna reacción espontánea del peróxido de hidrógeno con el aldehído, ambos productos de la alcohol oxidasa, *in vivo*. Además, un trabajo reciente con el citocromo P450 de *Candida maltosa* (Scheller et al., "Oxygenation Cascade in Conversion of n-Alkanes to α, ω - Dioic Acids Catalyzed by Cytochrome P450 52A3", J of Biological Chemistry, 273, páginas 32528 - 32534, 1998) y *C. tropicalis* (Eschenfeldt et al., "Transformation of Fatty Acids Catalyzed by Cytochrome P450 Monooxygenase Enzymes of *Candida tropicalis*", Applied and Environmental Microbiol., 69, páginas 5992 - 5999, 2003) han demostrado *in vitro* que esta enzima puede catalizar todas las reacciones de la ruta de oxidación ω . Esto produciría el ácido carboxílico con el consumo obligatorio de tres moles de oxígeno por cada pasada a través de la ruta.

50

Ejemplo 11

Expresión alternativa de la tasa de biooxidación y las ecuaciones de control

5 En la realización preferida de esta invención, las tasas de consumo de sustrato y cosustrato se determinan a partir de los balances de los componentes gaseosos (la línea estequiométrica). Se hacen ajustes proporcionales para las tasas de alimentación del sustrato y el cosustrato (la línea de operación).

Se ha encontrado que se puede aplicar fácilmente una alternativa para aquellos que buscan poner a prueba los métodos de esta invención que es idéntica a la forma de realización preferida para una amplia gama de reacciones de biooxidación.

10 Este método alternativo hace uso del mismo sistema de reacciones simultáneas 1 - 5 ya descritas en la presente memoria. En este análisis, sin embargo, se hacen las siguientes simplificaciones y definiciones:

1) La tasa de Reacción 4 se asume como cero, o se la hace ser cero temporalmente, para propósitos experimentales, es decir, $\psi = 0$.

2) Las tasas de las Reacciones 1 y 2 se definen en términos del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, respectivamente.

15 3) El coeficiente estequiométrico en el cosustrato en la Reacción 1 se asume que es 0, o se la hace ser cero temporalmente, para propósitos experimentales, es decir $c_1 = 0$.

De acuerdo con la estequiometría de la Reacción 1, entonces la tasa de reacción 1 se puede expresar en términos de consumo de oxígeno como

$$r_{1a} = (b_1/a_1) r_1 \quad \text{Ecuación 12}$$

20 De manera similar, a partir de la estequiometría de la reacción 2, la tasa de reacción 2 puede ser expresada en términos de producción de dióxido de carbono como

$$r_{2a} = - (e_2/c_2) r_2 \quad \text{Ecuación 13}$$

Sustituyendo la Ecuación 7 en la ecuación 12, sometido a los supuestos anteriores se obtiene

$$r_{1a} = \frac{-r_{O_2} - (b_2/e_2)r_{CO_2}}{1 - (b_2/e_2)(e_1/b_1)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Esta Ecuación 14 suministra la tasa de oxidación del sustrato en términos de consumo de oxígeno por medio de la Reacción 1.

25 De manera similar, sustituyendo la Ecuación 7 y 4 en la Ecuación 13 sometidos a los supuestos anteriores se obtiene la tasa de combustión del cosustrato en términos de la producción de dióxido de carbono.

$$r_{2a} = \frac{-r_{CO_2} - (e_1/b_1)r_{O_2}}{1 - (b_2/e_2)(e_1/b_1)} \quad \text{Ecuación 15}$$

Las reacciones simultáneas resultantes para la oxidación del sustrato y la combustión del cosustrato en realidad describen una amplia gama de reacciones potenciales de biooxidación. Esta forma alternativa también es útil para medir en forma independiente la estequiometría de la reacción cuando la estequiometría de la reacción no es conocida o es incierta.

30 Un gráfico de r_{2a} y R_{1a} utilizando las Ecuaciones 15 y 14, respectivamente, en función del tiempo durante el transcurso de la fermentación establece las líneas de equilibrio para la fermentación.

Ahora es posible establecer las líneas de operación del sustrato y del cosustrato en términos del consumo esperado

de oxígeno por oxidación del sustrato y una producción esperada de dióxido de carbono por la combustión del cosustrato, respectivamente.

Entonces para la oxidación del sustrato,

$$F_s \text{ punto de referencia} = 0.001 A_3 (a_1/b_1) (Mw_s/X_s) (-r_{1a}) V_f \quad \text{Ecuación 16}$$

5 La línea de operación sustrato se define entonces por medio de un gráfico de $-r_{1a}$ (teórico) durante el transcurso de la biooxidación de acuerdo con la Ecuación 17.

$$-r_{1a} \text{ (teórico)} = F_s (b_1/a_1) \frac{X_s Mw_s}{V_f} \quad \text{Ecuación 17}$$

En forma similar, para el cosustrato,

$$F_c \text{ punto de referencia} = 0.001 A_4 (c_2/e_2) (Mw_c/X_c) (-r_{2a}) V_f \quad \text{Ecuación 18}$$

La línea de operación del cosustrato se define entonces por medio de un gráfico de r_{2a} (teórico) durante el transcurso de la biooxidación de acuerdo con la Ecuación 17.

$$-r_{2a} \text{ (teórico)} = F_c (e_2/c_2) \frac{X_c Mw_c}{V_f} \quad \text{Ecuación 19}$$

10 A pesar de las anteriores presunciones, este método alternativo podría ser utilizado satisfactoriamente para fines de control, incluso cuando el cosustrato se consume en la reacción 1 y cuando alguna acumulación de biomasa es deseable (Reacción 4) simplemente mediante la práctica de los métodos de la presente invención utilizando valores operativos de A_4 mayores que 1.

15 Hemos encontrado que este método produce resultados satisfactorios de biooxidación en instalaciones donde no todas las fórmulas de comparación y de control se programan en un ordenador, sino donde únicamente OUR y CER se dan como variables derivadas. Estos cálculos simplificados de control se hace fácilmente con una calculadora manual. Los inventores han aplicado estos cálculos en el laboratorio para reacciones piloto de biooxidación a gran escala.

Ejemplo 12

20 Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta el ácido 9-octadecenodioico por medio de oxidación ω : Preparación de la alimentación del sustrato de ácido oleico

Se añadieron aproximadamente 1500 kg de un sustrato de ácido oleico que tiene la composición mostrada en la Tabla 12.1 a un tanque de alimentación estéril. Se determinó el peso molecular promedio del ácido graso a partir de esta composición y se encontró que era de 281,1 g/gmol utilizando el método análogo a aquel para el cosustrato.

25 Se encontró una determinación similar hecha por espectroscopía de masas para obtener una fórmula química empírica para esta mezcla de ácidos grasos de $C_{17,92}H_{33,86}O_2$ que tienen un peso de fórmula empírica de 281,4 g/gmol, que se aproxima mucho el cálculo anterior. Esta fórmula puede escribirse también para reflejar la estructura básica del ácido graso como $CH_3C_{15,92}H_{29,86}COOH$, recordando el objetivo de oxidar el metilo terminal hasta un carboxilo a través de oxidación ω .

30 Esta alimentación de sustrato no contiene coadyuvantes de procesamiento ni otros componentes sin metabolizar, por lo tanto $X_s = 1$.

Los parámetros estequiométricos para la Reacción 1 de oxidación del sustrato, asumiendo que la estequiometría propuesta de la oxidación ω del Ejemplo 10 y de la Figura 3 es correcta, entonces para $a_1 = 1$, $b_1 = 1,5$, $c_1 = 0$, $d_1 = 1$, $e_1 = 0$, $f_1 = 1$.

Tabla 12.1. Composición del ácido oleico	
Ácido graso componente	% en peso
Ácido láurico	0,1
Ácido mirístico	0,1
Ácido pentadecanoico	0,1
Ácido palmítico	3,8
Ácido palmitoleico	0,1
Ácido esteárico	4,7
Ácido oleico	85
Ácido linoleico	5,2
Ácido linolénico	0,4
Ácido eicosenoico	0,3

Ejemplo 13

Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta ácido 9-octadecenodioico por medio de oxidación ω utilizando un cosustrato de glucosa: configuración de las fórmulas de control

- 5 Dado que se mantiene la incertidumbre en la estequiometría de la oxidación ω , fue necesario primero verificar la estequiometría de la reacción propuesta en el Ejemplo 10 y en la Figura 3. Para hacer esto, se seleccionó una alimentación de cosustrato de glucosa bien caracterizada y se controló su tasa de alimentación de acuerdo con los métodos de esta invención. Del mismo modo, se usó un sustrato bien caracterizado de ácido oleico aunque su tasa de alimentación no se controló pendiente de la verificación de la estequiometría de la reacción. Se construyeron las
- 10 líneas estequiométrica y de operación del sustrato suponiendo que la estequiometría propuesta de la oxidación ω era correcta.

- De este modo se oxidó la alimentación de ácido oleico del Ejemplo 12 por medio de una oxidación β , *Candida tropicalis* H 5343 bloqueada como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.254.466, utilizando la alimentación de glucosa del Ejemplo 5. Se controló la biooxidación utilizando el método del Ejemplo 11 usando los
- 15 parámetros estequiométricos y de operación para estas alimentaciones respectivas.

La tasa de biooxidación se obtiene mediante la sustitución de los parámetros en la Ecuación 14 para dar

$$r_{1a} \cdot V_f = \frac{-r_{O_2} - (6/6)r_{CO_2}}{1 - (6/6)(0/1.5)} = (-r_{O_2} - r_{CO_2}) \cdot V_f = (-OUR + CER) \cdot V_f \quad \text{Ecuación 13.1}$$

Del mismo modo, para la tasa de combustión del cosustrato utilizando la Ecuación 15 se obtiene

$$r_{2a} \cdot V_f = \frac{-r_{CO_2} - (0/1.5)r_{O_2}}{1 - (6/6)(0/1.5)} \cdot V_f = -r_{CO_2} \cdot V_f = -CER \cdot V_f \quad \text{Ecuación 13.2}$$

Entonces, se determina la tasa de la reacción de biooxidación por medio de la diferencia en OUR y CER mientras que la tasa de consumo de cosustrato se determina a partir de la CER.

Los puntos de referencia de la tasa de alimentación del sustrato y el cosustrato se determinan mediante la sustitución de los parámetros estequiométricos y de operación indicados en las Ecuaciones 16 y 18, respectivamente.

$$F_s \text{ punto de referencia} = 0.001 A_3 (1/1.5) (281.4/1.0) (\text{OUR-CER}) V_f \quad \text{Ecuación 13.3}$$

$$F_c \text{ punto de referencia} = 0.001 A_4 (1/6) (180.16 / 0.505) (\text{CER}) V_f \quad \text{Ecuación 13.4}$$

5 La línea de operación para la alimentación de sustrato se obtiene entonces mediante la sustitución de los parámetros estequiométricos y de operación apropiados en la Ecuación 17.

$$-r_{1a} \text{ (teórico)} \cdot V_f = F_s \cdot (1.5/1) \cdot 1.0 \cdot (281) \quad \text{Ecuación 13.5}$$

Esta ecuación 13.5 se refiere a la tasa de alimentación del sustrato F_s con la misma base que la usada para la construcción de la línea estequiométrica. Es decir, calcula cuál sería el consumo esperado de oxígeno si todo el ácido oleico se convierte en producto de acuerdo con la estequiometría de la reacción. La tasa de alimentación real puede ser mayor, igual a, o menor que la tasa de reacción de acuerdo con el valor seleccionado para A_3 .

10 De manera similar, la línea de operación del cosustrato se obtiene por medio de la sustitución de los parámetros estequiométricos y de operación apropiados en la Ecuación 19

$$r_{2a} \text{ (teórico)} \cdot V_f = F_c \cdot (6/1) \cdot 0.505 \cdot 180 \quad \text{Ecuación 13.6}$$

15 Esta ecuación 13.6 se refiere a la tasa de alimentación del cosustrato F_c con la misma base que la usada para la construcción de la línea estequiométrica. Es decir, calcula cuál sería la producción esperada de dióxido de carbono si toda la glucosa se convierte en producto de acuerdo con la estequiometría de la combustión. La tasa de alimentación real puede ser mayor, igual a, o menor que la tasa de reacción de acuerdo con el valor seleccionado para A_4 .

20 La fermentación se representa luego gráficamente por medio de dos grupos de gráficos. El primer gráfico compara la tasa de combustión del cosustrato representada por la $\text{CER} \cdot V_f$ (línea estequiométrica) y se compara con un $\text{CER} \cdot V_f$ teórico calculado para la tasa de alimentación de glucosa predominante $-r_{2a} \text{ (teórico)} \cdot V_f$ (línea de operación). El segundo gráfico compara la tasa de oxidación ω , representada por $(\text{OUR-CER}) \cdot V_f$ (línea estequiométrica) y se compara con un valor teórico $(\text{OUR-CER}) \cdot V_f$ calculado para la tasa de alimentación prevaeciente del ácido oleico $r_{1a} \text{ (teórico)} \cdot V_f$ (línea de operación).

25 Estas fórmulas se pueden ejecutar en un bucle de control de retroalimentación automática. En la práctica, hemos logrado buenos resultados simplemente controlando la fermentación y haciendo ajustes periódicos a la tasa de alimentación.

Ejemplo 14

Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta ácido 9-octadecenodioico por medio de oxidación ω utilizando un cosustrato de glucosa

30 Se cargó un fermentador con 9700 kg de medio de crecimiento artificial como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.569.670. El volumen de fermentación definido por el usuario se fijó en 1000 kg de tal manera que los datos de CER y OUR tenían unidades de gmoles / h. Se inoculó el medio con 300 kg de un cultivo en crecimiento activo de una levadura de *Candida tropicalis* bloqueada para oxidación β del Ejemplo 13 y cultivada en la mismo medio. El cultivo a 35° C rápidamente entró en crecimiento exponencial y se mantuvo el pH en 6,8 utilizando una solución de potasa cáustica. Se preparó una alimentación de cosustrato de glucosa al 50,5% a partir del monohidrato de dextrosa usando el método del Ejemplo 5, donde se dan los parámetros estequiométricos y de operación para esta alimentación. Se inició la alimentación de cosustrato cerca del final de la fase de crecimiento exponencial a una tasa de 23,9 kg / h.

40 Al final de la fase de crecimiento limitada por la glucosa, a juzgar por una disminución rápida en la OUR y la CER y un rápido incremento en el oxígeno disuelto, se añadió una carga de 46,6 kg de ácido oleico. Esto indujo la ruta de oxidación ω . La tasa de alimentación de ácido oleico se inició aproximadamente 3 horas después a razón de 18,5 kg / hora y se mantuvo constante durante el lote para controlar la cinética de oxidación ω . Se disminuyó la temperatura

a 30° C y se mantuvo el pH en 5,8 utilizando una solución de potasa cáustica durante la fermentación. La concentración de biomasa en la inducción (tiempo de biooxidación 0) era de 17,8 g de peso seco / kg de caldo.

5 La Figura 4 muestra el transcurso de este lote de fermentación. Se ajustó periódicamente la tasa de alimentación de glucosa de acuerdo con las fórmulas del Ejemplo 13, utilizando efectivamente un valor de 1 para A_4 . Se controló la reacción de oxidación ω utilizando la fórmula del Ejemplo 13 y la tasa de alimentación constante se representa por medio de la línea de operación del sustrato dibujada para $b_1/a_1 = 1,5$. Las tasas de alimentación del sustrato y del cosustrato, F_s y F_c , respectivamente, fueron controladas por medio de la disminución en los niveles del tanque. Los picos de ruido en la línea de operación del sustrato se debieron, no a las fluctuaciones reales en la tasa de alimentación, sino que más bien se debieron al relleno periódico del tanque de alimentación pequeño durante la fermentación.

También se muestra en la Figura 3 la acumulación de diácidos, ácidos grasos sin reaccionar, determinados por medio de cromatografía de gases, como sus derivados de ésteres metílicos. No se detectó la glucosa en las muestras de fermentación evaluadas utilizando cromatografía líquida de intercambio iónico con un detector de índice de refracción.

15 La línea estequiométrica del sustrato claramente muestra la inducción de la ruta de oxidación ω durante las primeras 10 horas de la fermentación. Esa actividad decayó por el resto de ese lote. Este experimento reveló la curvatura significativa en las líneas estequiométricas, es decir, las tasas de reacción cambian continuamente durante el transcurso de la reacción.

20 En ausencia de las técnicas de esta invención, solo queda adivinar a qué tasa de alimentación debería ser; realizar un gran número de ensayos a pequeña escala con diferentes horarios de alimentación que pueden en última instancia no tener relevancia para un reactor a escala comercial; o realizar un gran número de pruebas analíticas de la muestra fuera de línea diferenciando entonces los resultados analíticos con respecto al tiempo para llegar a una tasa predominante (a menos era la tasa cuando se tomó la última muestra). Entonces, si se produce una alteración en el proceso, piénselo otra vez o espere de ocho a doce horas, y luego tome otra muestra para ver qué cambios deben hacerse. Hemos encontrado que estos métodos consumen tiempo en forma frustrante, son costosos, y en última instancia ineficaces para el control de la reacción de biooxidación.

30 Se presentó una pequeña acumulación de biomasa durante el proceso con lotes ya que la velocidad de alimentación del cosustrato era periódicamente reducida solo hasta la cantidad que podría ser convertida en dióxido de carbono para fines energéticos. Por lo tanto, no había carbono adicional disponible para crecimiento. La recuperación de células viables cultivables se redujo en un factor de diez entre la inducción y el final del lote, sin embargo, la actividad de la oxidación ω , a juzgar por la línea estequiométrica del sustrato se redujo sólo aproximadamente a la mitad. Los ácidos grasos se acumularon durante la reacción como sería de esperar ya que la línea de operación estaba muy por encima de la línea estequiométrica hasta que la alimentación de sustrato terminó en aproximadamente 95 horas dentro del lote.

35 Ejemplo 15

Oxidación de alcanos y de ácidos grasos hasta ácidos dicarboxílicos: determinación de los parámetros estequiométricos del sustrato a partir de los datos experimentales

40 Los datos del Ejemplo 14 son ahora útiles para verificar la estequiometría de la ruta de oxidación ω mediante el examen de la producción acumulada de diácidos en cada punto de la muestra y el consumo acumulado de oxígeno por medio de la ruta de la oxidación ω . Es decir, para cada tiempo de muestreo t , la relación estequiométrica d_1/b_1 está dada por

$$b_1/d_1 = \frac{MW_{\text{diácidos}} \int_{t=\text{inducción}}^t (r_{1a} \cdot V_f) dt}{X_{\text{diácidos}} \cdot M(t)} \quad \text{Ecuación 15.1}$$

La integral se evalúa numéricamente utilizando los datos de la línea estequiométrica de sustrato en línea. Esta es el área bajo la curva como se muestra en la Figura 4 usando los datos del Ejemplo 14, que pueden ser evaluados desde el tiempo de inducción 0 hasta cualquier punto posterior en el tiempo.

45 Un gráfico de oxígeno acumulado consumido por la oxidación ω en comparación con los diácidos producidos muestra la proporción b_1/d_1 como se muestra en la Figura 5 usando los datos del Ejemplo 14. Un ajuste por mínimos cuadrados de los datos produce la pendiente de la línea como 1,46 gmoles de O_2 /gmoles de diácido, muy cerca de la estequiometría esperada de 1,5 sugerida por los datos de la literatura del Ejemplo 10.

Ejemplo 16

Oxidación de alcanos y ácidos grasos hasta ácidos dicarboxílicos: determinación de los parámetros estequiométricos del sustrato a partir de datos experimentales

5 Una vez verificada la estequiometría de la reacción, ahora es posible hacer predicciones acerca de la composición del caldo de fermentación con base únicamente en los datos en línea. Se determina luego la concentración de diácido resolviendo la Ecuación 15.1 para $X_{\text{diácidos}}$ realizando luego la integración indicada de los datos de la tasa y recolectando los datos de la masa trabajando en el recipiente. El resultado, utilizando los datos del Ejemplo 14, se muestra en la Figura 6 comparado con el análisis de la muestra fuera de línea. Usando este método se reduce la necesidad de análisis de la muestra fuera de línea.

10 **Ejemplo 17**

Oxidación de un sustrato de alcano hasta ácidos dicarboxílicos por medio de oxidación ω : determinación comparativa de la estequiometría de la reacción

15 Fue útil analizar nuevamente la estequiometría de la ruta de oxidación ω usando un sustrato que tiene diferentes parámetros estequiométricos y de operación. Se preparó una alimentación con el alcano como sustrato por medio de filtración esterilizante de alcanos NORPAR (un producto de Exxon) en un recipiente estéril de alimentación. La Tabla 17.1 muestra la composición de este sustrato alcano obtenido por cromatografía de gases. El peso molecular promedio de los alcanos en esta mezcla era de 186,6. En contraste con el sustrato de ácido graso del Ejemplo 12, donde únicamente se requiere de una pasada a través de la ruta de oxidación ω para elaborar los diácidos correspondientes, el alcano requiere de dos pasadas. Luego se necesitaron tres moles de oxígeno para oxidar un mol de sustrato hasta un mol de producto. Los parámetros estequiométricos para la Reacción 1 de oxidación del sustrato, usando la estequiometría de oxidación ω del Ejemplo 10 y la Figura 3, para $a_1 = 1$, $b_1 = 3$, $c_1 = 0$, $d_1 = 1$, $e_1 = 0$, $f_1 = 1$.

25 Se llevó a cabo una biooxidación usando este sustrato de alcano con una alimentación de glucosa similar a la utilizada para el Ejemplo 14 aunque aproximadamente a un décimo de la escala de fermentación. Las fórmulas de control del Ejemplo 13, con sujeción a los parámetros estequiométricos y de operación para este sustrato, determinadas anteriormente, se utilizaron para monitorear la biooxidación y controlar la alimentación de glucosa.

La Figura 8 muestra los datos graficados de acuerdo con el método del Ejemplo 15 para obtener la relación $b_1/d_1 = 2,97$ gmoles de O_2 / gmoles de diácido. Esto es consistente con dos pasadas a través de la ruta de oxidación ω de la Figura 3.

Ácido graso componente	% en peso
undecano	0,2
dodecano	14,1
tridecanp	52,5
tetradecano	32,4
pentadecano	0,6

30

Ejemplo 18

Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta ácidos dicarboxílicos por medio de oxidación ω utilizando un cosustrato de glucosa: controlar simultáneamente la alimentación de sustrato y de cosustrato.

35 Se cargó un fermentador con 86 toneladas métricas de medio de crecimiento artificial. Se inoculó el medio con 1,4 toneladas métricas de un cultivo de crecimiento activo de una levadura *Candida tropicalis* bloqueada por oxidación β cultivada en un medio complejo de glucosa / extracto de levadura / peptona. El cultivo a 35 ° C entró rápidamente en crecimiento exponencial y se mantuvo el pH a 5,8 con amoníaco gaseoso. Se preparó un alimento de cosustrato de

glucosa al 45,2% utilizando el método del Ejemplo 6 donde se suministran los parámetros estequiométricos y de operación para esta alimentación. Se inició la alimentación del cosustrato cerca del extremo de la fase de crecimiento exponencial a una tasa de 250 kg / h.

5 Se preparó una alimentación de sustrato de ácido oleico similar a la del método del Ejemplo 12 excepto porque se esterilizó esta alimentación por calentamiento directo con vapor. Como resultado, se condensó esta alimentación que contenía aproximadamente 17,7% de vapor. Por lo tanto, el parámetro de operación, X_s , para esta alimentación fue de 0,82. Los otros parámetros estequiométricos y de operación eran los mismos.

10 Al final de la fase de crecimiento limitada por la glucosa, a juzgar por una rápida disminución en OUR y CER y un rápido incremento en oxígeno disuelto, se añadió una carga de 410 kg de la alimentación del sustrato de ácido oleico. Esto indujo la ruta de oxidación ω . La tasa de alimentación del sustrato de ácido oleico se inició por medio de la adición en forma periódica de cargos de la alimentación del sustrato para producir una tasa de alimentación promedio con respecto al tiempo de aproximadamente 140 kg / h. El período utilizado para estas adiciones de alimentación de sustrato era típicamente de 1-3 horas. Se disminuyó la temperatura hasta 30°C y se mantuvo el pH en 5,8 utilizando una solución de soda cáustica durante el proceso de fermentación. La concentración de biomasa en la inducción (tiempo 0 de biooxidación) fue de 19,2 g en peso seco / kg de caldo.

La Figura 9 muestra el transcurso, incluido el rendimiento, para esta reacción de biooxidación. La tasa de alimentación del cosustrato fue periódicamente ajustada según fuera necesario en respuesta a las tendencias de la línea estequiométrica. En forma similar, se incrementó la tasa de alimentación de ácido oleico en respuesta a los datos de la línea estequiométrica del sustrato, aquí en tres etapas durante las primeras diez horas.

20 Este lote entró en una fase entre la hora 10 y aproximadamente la hora 25 cuando se desarrollaron características reológicas desfavorables y declinó la actividad de la oxidación ω . La tasa de alimentación del sustrato no fue cambiada sin embargo, ya que se encontró que permitiendo la acumulación del ácido oleico residual, se ayudaba a mitigar la reología desfavorable del caldo. Este fenómeno es apenas perceptible a partir de la tendencia en los datos fuera de línea (un método diferencial), que puede ser atribuido a la dispersión aleatoria de los datos. El efecto total sobre la actividad de la oxidación ω , sin embargo, es bastante pronunciada a juzgar por los métodos integrales sensibles de esta invención.

30 A medida que el lote progresó, se disminuyó la tasa de alimentación del sustrato en respuesta a que la línea estequiométrica del sustrato detiene la acumulación adicional de sustrato sin reaccionar. La pérdida de alimentación de sustrato entre la hora 66 y la hora 72 fue un proceso no planeado molesto que, en este caso tuvo poco efecto sobre la reacción de biooxidación. La concentración final de biomasa observada al final del lote fue de 8,4 g / kg. En general, esta biooxidación consumió 0,54 kg de alimentación de glucosa (en base anhidra) por cada kilogramo de diácido producido.

35 La concentración de diácido en el caldo calculada utilizando el método del Ejemplo 16 era muy cercana a las concentraciones determinadas en forma independientemente por medio de cromatografía de gases. Posteriormente se encontró que el convenio mejoraba significativamente si se consideraba el oxígeno consumido para elaborar la pequeña cantidad de hidroxiacidos ω acumulados en la construcción de la curva estequiométrica de diácidos.

40 En este ejemplo, los valores de A_3 y A_4 variaron durante el procesamiento por lotes ya que los ajustes necesarios de las tasas de alimentación del sustrato y del cosustrato, respectivamente, se hicieron en intervalos poco frecuentes. El sustrato cumple varios múltiples propósitos en esta biooxidación, ya que no solamente era el sustrato para la biooxidación, sino también el inductor de la ruta de biooxidación y cumple algunas funciones para la modificación de la viscosidad del caldo. Por lo tanto, fue útil permitir la acumulación de algún sustrato residual de ácido graso durante la primera parte del lote operando con un A_4 mayor que 1. Más adelante en el lote, para reducir los monoácidos acumulados, se disminuyó efectivamente A_4 hasta 1, luego hasta cero para convertir los monoácidos residuales. Son posibles intervalos de ajuste más frecuentes si se desea, para limitar la acumulación de sustrato.

45 Hemos encontrado que el control de la tasa de alimentación a nivel de ruido en los datos de balance de los componentes gaseosos no es deseable. Es útil en estos casos o bien aplicar ya sea una técnica de suavizamiento a los datos o escoger una banda muerta apropiada para hacer los ajustes.

Ejemplo comparativo 1

50 Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta ácidos dicarboxílicos por medio de oxidación ω utilizando un cosustrato de glucosa: Sin control de la tasa d alimentación del sustrato o del cosustrato.

Los métodos de la presente invención han probado ser muy útiles para la comprensión de las características de la reacción de biooxidación. Sin embargo, antes de esto, se corrió simplemente la reacción por medio del uso de una tasa de alimentación constante del cosustrato o por medio del desarrollo empírico de un conjunto de cambios programados en la tasa de alimentación del cosustrato. Los análisis fuera de línea de glucosa residual probaron ser

imprácticos debido a que la concentración era inconmensurablemente baja. Se hicieron frecuentemente ajustes a la tasa de alimentación del sustrato, ya sea en respuesta a un análisis por cromatografía de gases fuera de línea del caldo o igualmente sobre un cronograma determinado empíricamente.

- 5 Una cepa productora de diácido bloqueada por oxidación β de *Candida tropicalis* fue cultivada sobre glucosa hasta una densidad de aproximadamente 18 g / kg con base en un volumen de 10 kg de caldo de fermentación. Se elaboró una alimentación de cosustrato de glucosa al 50% en agua a partir de monohidrato de dextrosa y se alimentó al cultivo cerca del final de la fase de crecimiento a razón de 36 gramos / hora. Esta tasa de alimentación de cosustrato se mantuvo constante a través del resto del lote.
- 10 Se inició una alimentación del sustrato de ácido oleico EMERSOL® cuando se agotó la glucosa utilizada para cultivar las células como se juzga por medio de un incremento rápido en el oxígeno disuelto. Esto indujo la ruta de oxidación ω . La tasa de alimentación del sustrato de ácido oleico fue ajustada inicialmente a razón de 18 g / h, pero se redujo hasta 15 g / h aproximadamente durante 48 horas en la reacción de biooxidación. Se detuvo completamente la alimentación de sustrato aproximadamente 90 horas dentro del lote. La Figura 10 muestra la acumulación de diácidos y de monoácidos durante cuatro ensayos separados.
- 15 La producción de diácidos fue inicialmente buena, pero se hizo muy lenta a medida que progresaba el lote. En general, la reacción de biooxidación operada en esta forma no controlada consumió 1,7 kg de glucosa por cada kg producido de diácido. Un examen más cercano mostró que se había acumulado biomasa hasta aproximadamente 45,5 g de peso seco / kg de caldo. La espectroscopía infrarroja de la muestra de biomasa seca mostró que estaba compuesta de 13% a 16% de ésteres de ácido graso de triacilglicerol. Por lo tanto, se presentaron reacciones
- 20 secundarias que involucran tanto al sustrato como al cosustrato con esta operación no controlada.

Ejemplo comparativo 2

Oxidación de un sustrato de ácido oleico hasta ácidos dicarboxílicos por medio de la oxidación ω utilizando un cosustrato de glucosa: adición excesiva de sustrato

- 25 Se estableció una reacción de biooxidación similar al método del Ejemplo 18 en donde se controló el cosustrato por medio del ajuste periódico de la tasa de alimentación del cosustrato con la línea estequiométrica del cosustrato. Se añadió una cantidad en exceso de sustrato (hasta 90 g / kg de monoácidos residuales) durante las primeras 10 horas de la reacción de biooxidación. Después de 21 horas del tiempo de biooxidación, el caldo contenía únicamente 14 g / kg de ácidos dicarboxílicos, pero el hidroácido ω intermedio producido desde la primera etapa de la ruta de oxidación ω (véase la Figura 3) se había acumulado hasta 13 g / kg. Por lo tanto, la falta de control de la
- 30 tasa de alimentación del sustrato redujo la productividad y condujo a la desviación del sustrato hasta la acumulación de una reacción de biooxidación intermedia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar una reacción de biooxidación que comprende las etapas de: (1) añadir de forma independiente un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste de un ácido carboxílico o un alcano y un cosustrato en tasas predeterminadas a una mezcla de reacción de biooxidación que cuanta con un biocatalizador que es Candida Tropicalis H5343, (2) la medición de la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono de la mezcla de reacción, (3) la determinación de las tasas instantáneas de consumo de sustrato y cosustrato por medio de la resolución de ecuaciones simultáneas en relación con la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono y la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la estequiometría de oxidación del sustrato, la estequiometría de combustión del cosustrato, y, opcionalmente, la estequiometría de formación de la biomasa; (4) ajustar simultáneamente las tasas de adición de sustrato y cosustrato con respecto a las tasas de oxidación del sustrato y de consumo del cosustrato con el fin de maximizar la tasa de formación de producto al mismo tiempo que se reduce al mínimo la tasa de uso del cosustrato.
2. El método de la reivindicación 1 en donde el ácido carboxílico es ácido oleico.
3. El método de la reivindicación 1 en donde el cosustrato es glucosa.
4. Un método para elaborar un ácido α,β -dicarboxílico que comprende las etapas de: (1) añadir de forma independiente un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste de un alcano, un alqueno, un alcohol, un aldehído, un ácido carboxílico o un derivado de los mismos y un cosustrato a tasas predeterminadas a una mezcla de reacción de biooxidación que se compone de un biocatalizador que es Candida Tropicalis H5343, (2) la medición de la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono de la mezcla de reacción, (3) la determinación de las tasas instantáneas de consumo de sustrato y cosustrato por medio de la resolución de ecuaciones simultáneas en relación con la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono y la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la estequiometría de oxidación del sustrato, la estequiometría de combustión del cosustrato, y, opcionalmente, la estequiometría de formación de la biomasa; (4) ajustar simultáneamente las tasas de adición de sustrato y cosustrato con respecto a las tasas de oxidación del sustrato y de consumo del cosustrato con el fin de maximizar la tasa de formación del ácido α,β -dicarboxílico al mismo tiempo que se reduce al mínimo la tasa de uso del cosustrato.
5. El método de la reivindicación 4 en donde el sustrato es un alcano.
6. El método de la reivindicación 4 en donde el sustrato es un ácido carboxílico.
7. El método de la reivindicación 6 en donde el ácido carboxílico es ácido oleico.
8. El método de la reivindicación 4 en donde el cosustrato es glucosa.
9. Un método para elaborar un ácido 9-octadecenodioico que comprende las etapas de: (1) añadir de forma independiente ácido oleico y glucosa a tasas predeterminadas a una mezcla de reacción de biooxidación que se compone de Candida Tropicalis H5343; (2) la medición de la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono de la mezcla de reacción; (3) la determinación de las tasas instantáneas de consumo de ácido oleico y glucosa por medio de la resolución de ecuaciones simultáneas en relación con la tasa de desprendimiento de dióxido de carbono y la tasa de consumo de oxígeno con respecto a la estequiometría de oxidación del ácido oleico, la estequiometría de combustión de la glucosa, y, opcionalmente, la estequiometría de formación de la biomasa; (4) ajustar simultáneamente las tasas de adición de ácido oleico y de glucosa con respecto a las tasas de oxidación del ácido oleico y de consumo de glucosa con el fin de maximizar la tasa de formación del ácido 9-octadecenodioico al mismo tiempo que se reduce al mínimo la tasa de uso de glucosa.

FIGURA 1

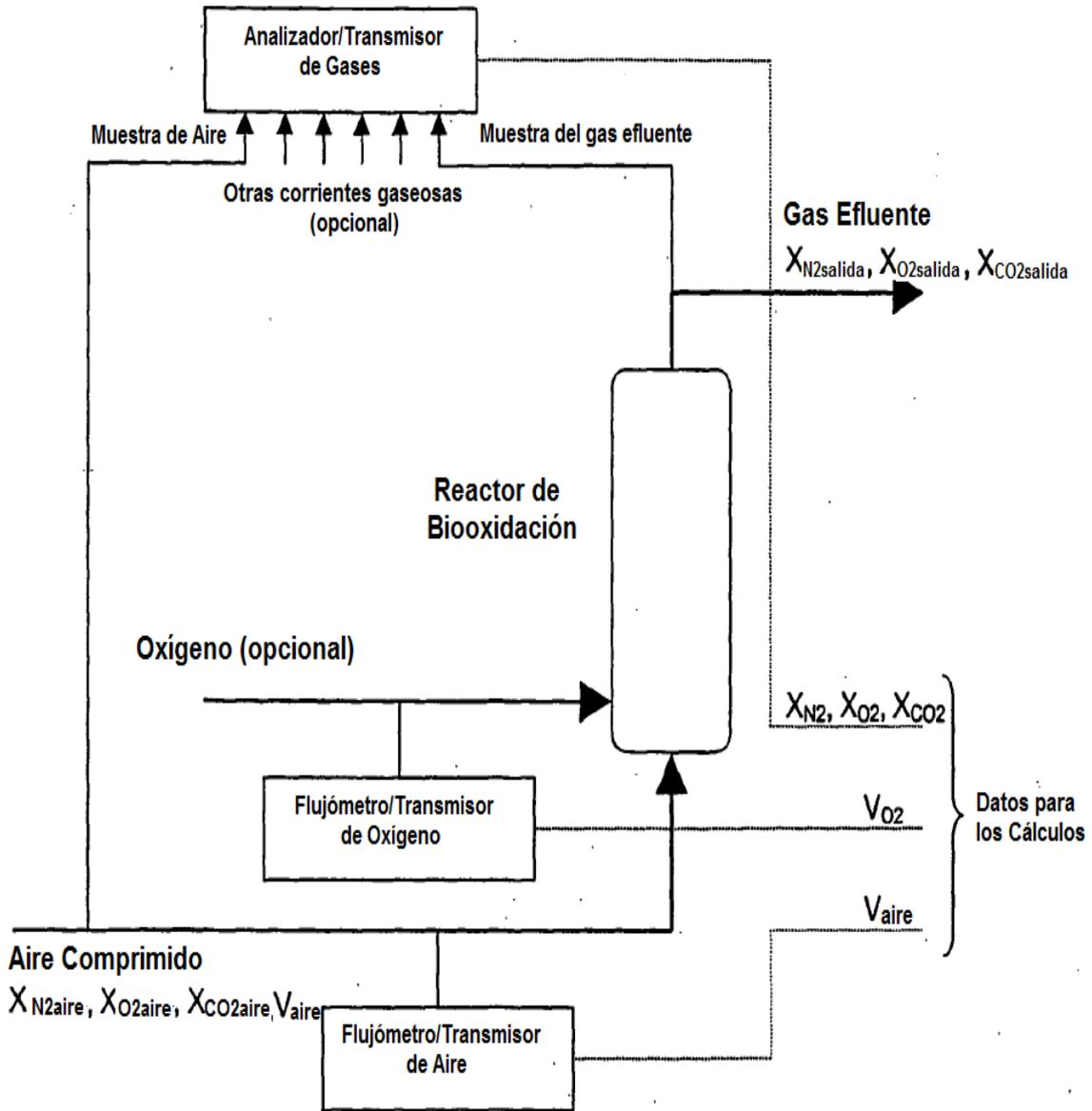
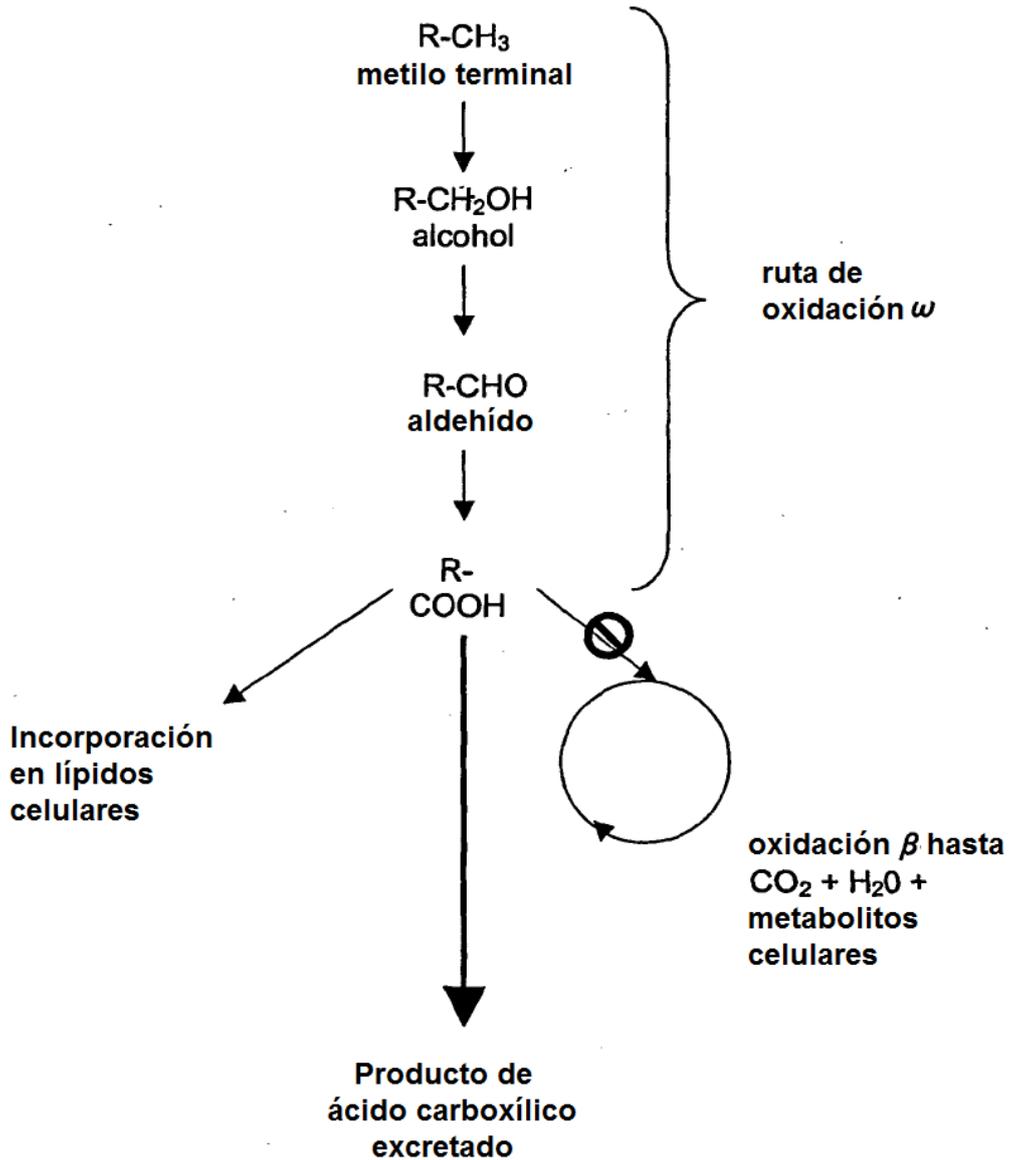


FIGURA 2



R = cualquier constituyente que tenga un grupo -CH₃ oxidable

= el extremo terminal de un alcano o alqueno con un total de 9 - 20 carbonos

= el extremo del ácido carboxílico de ácido graso saturado o insaturado con un total de 9 - 20 carbonos

FIGURA 3

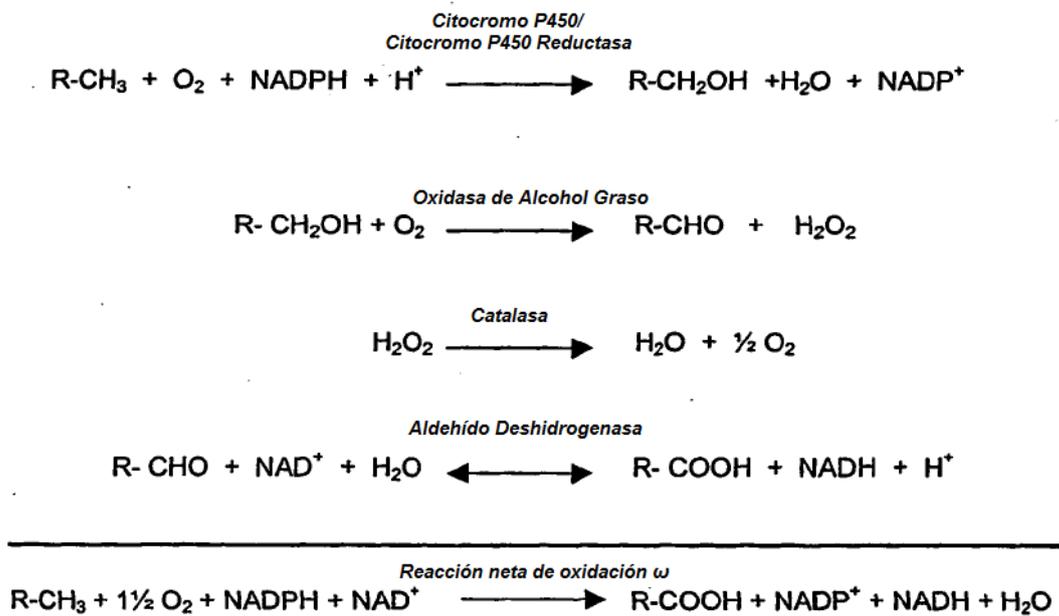


FIGURA 4

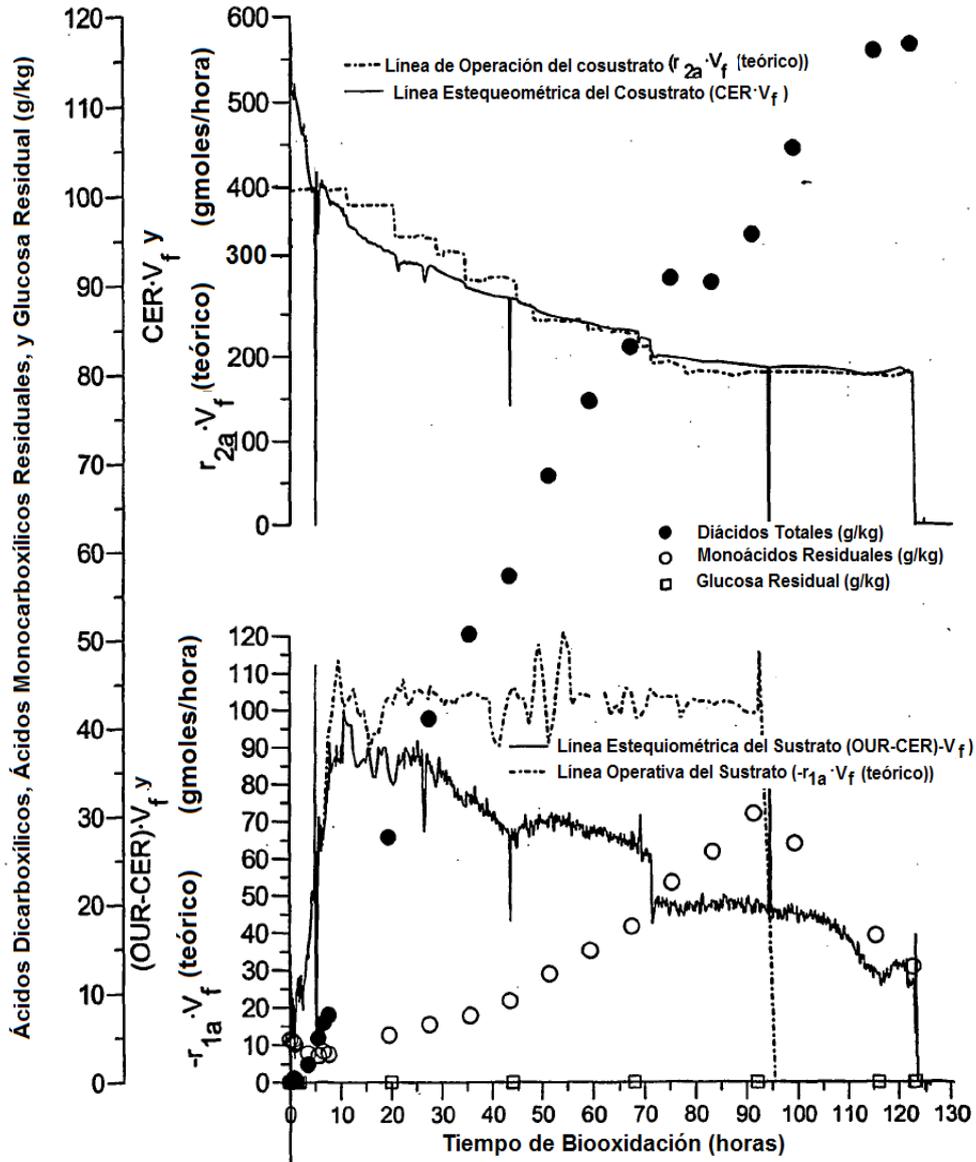


FIGURA 5

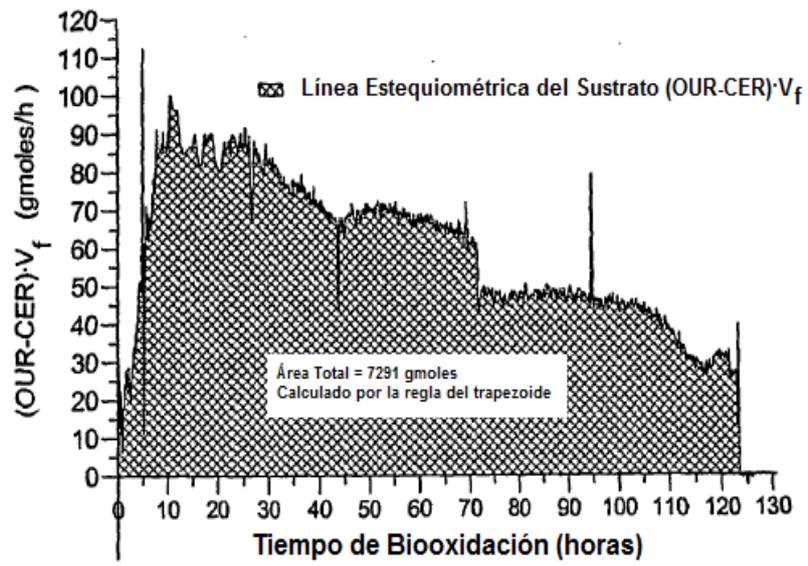


FIGURA 6

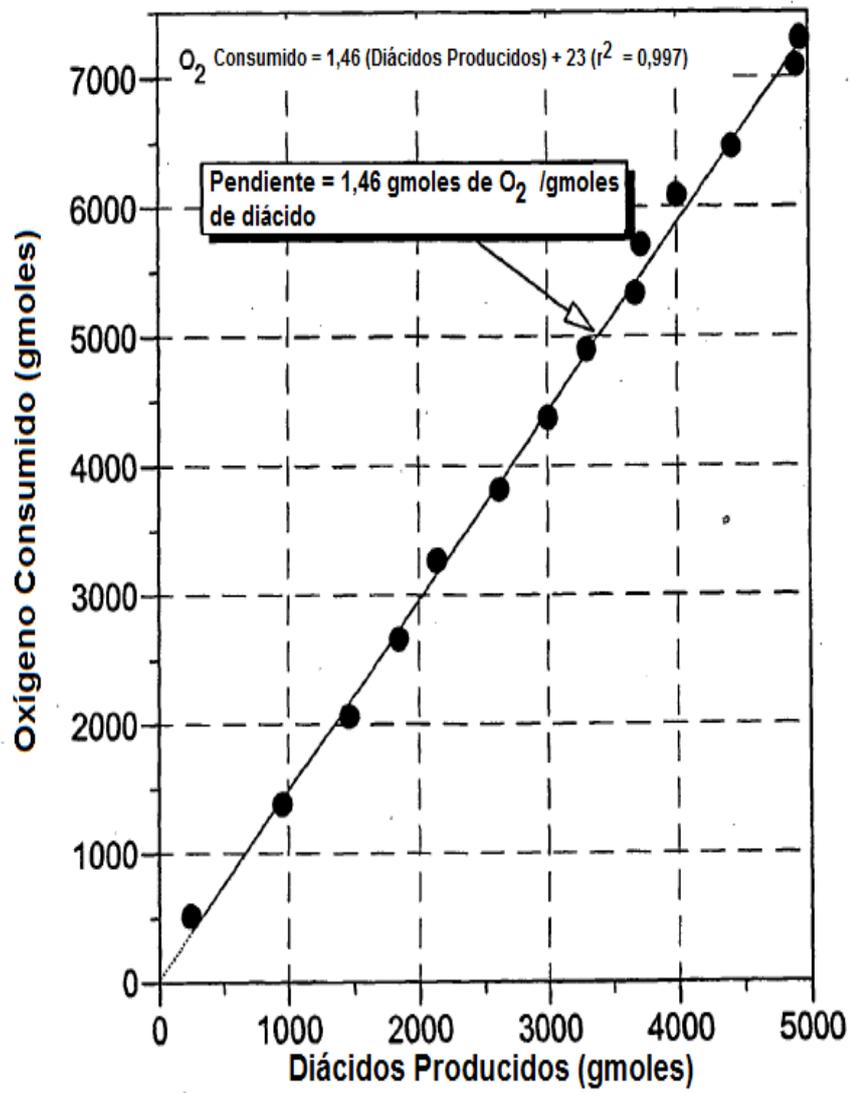


FIGURA 7

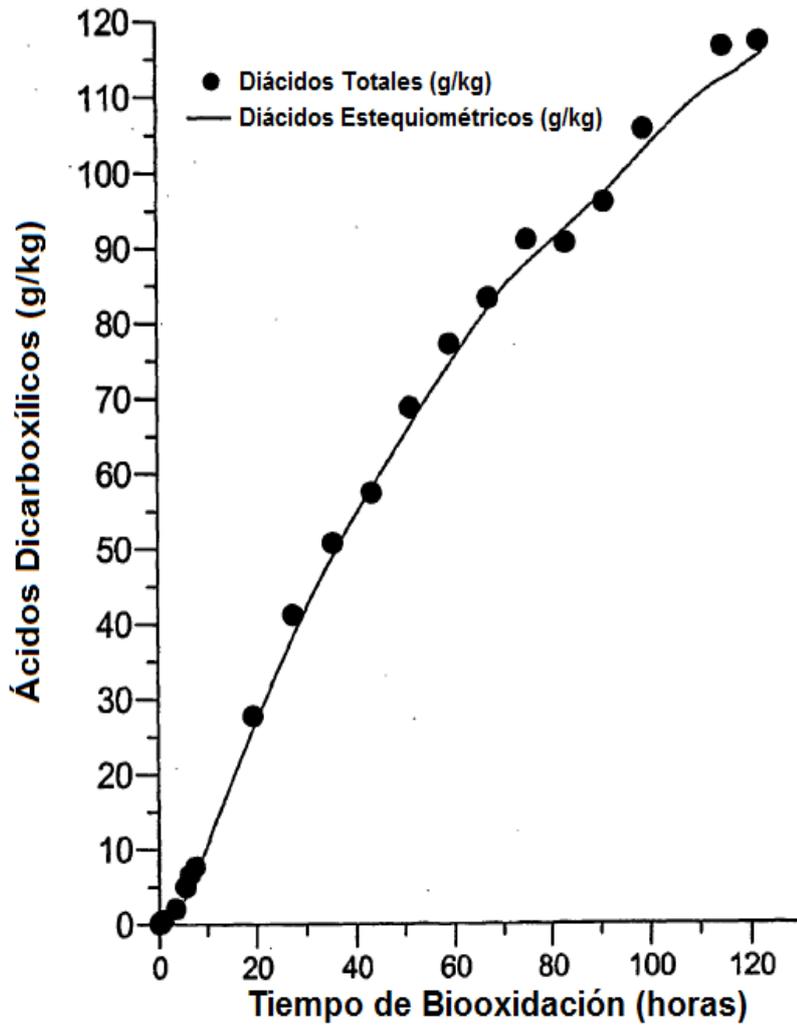


FIGURA 8

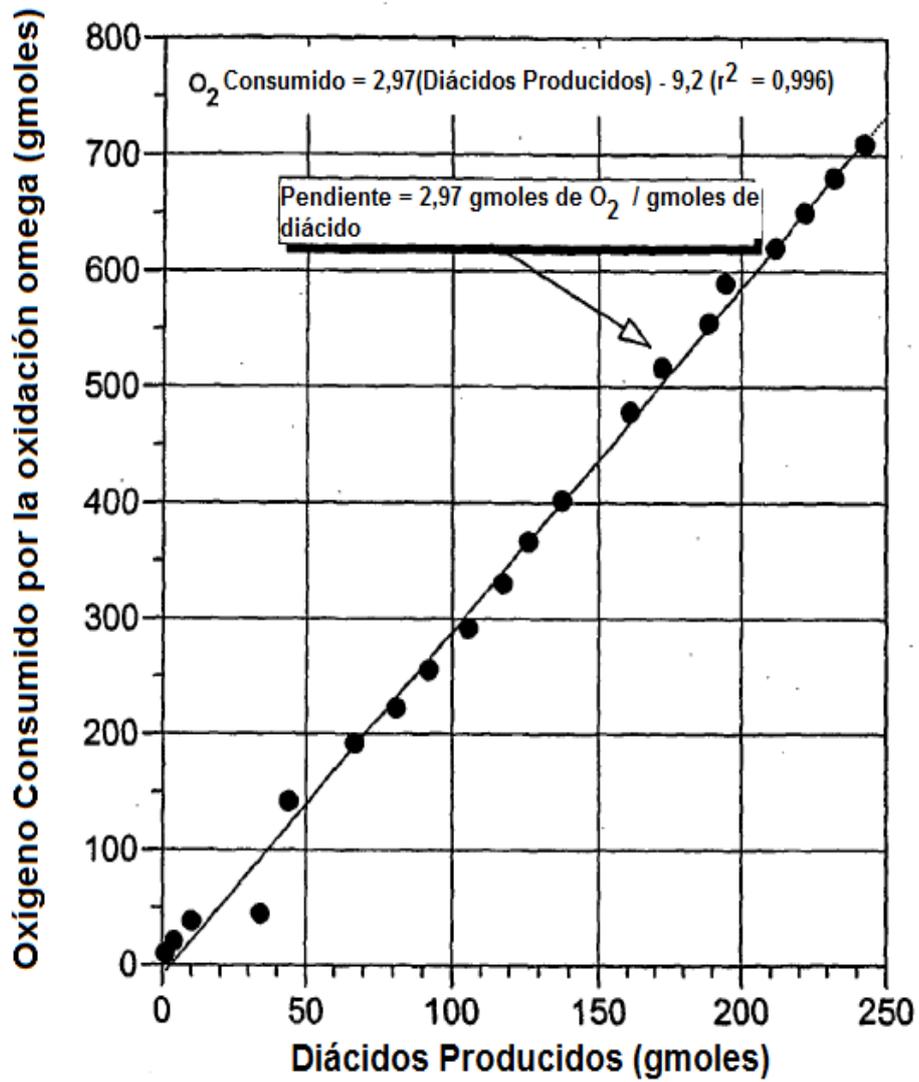


FIGURA 9

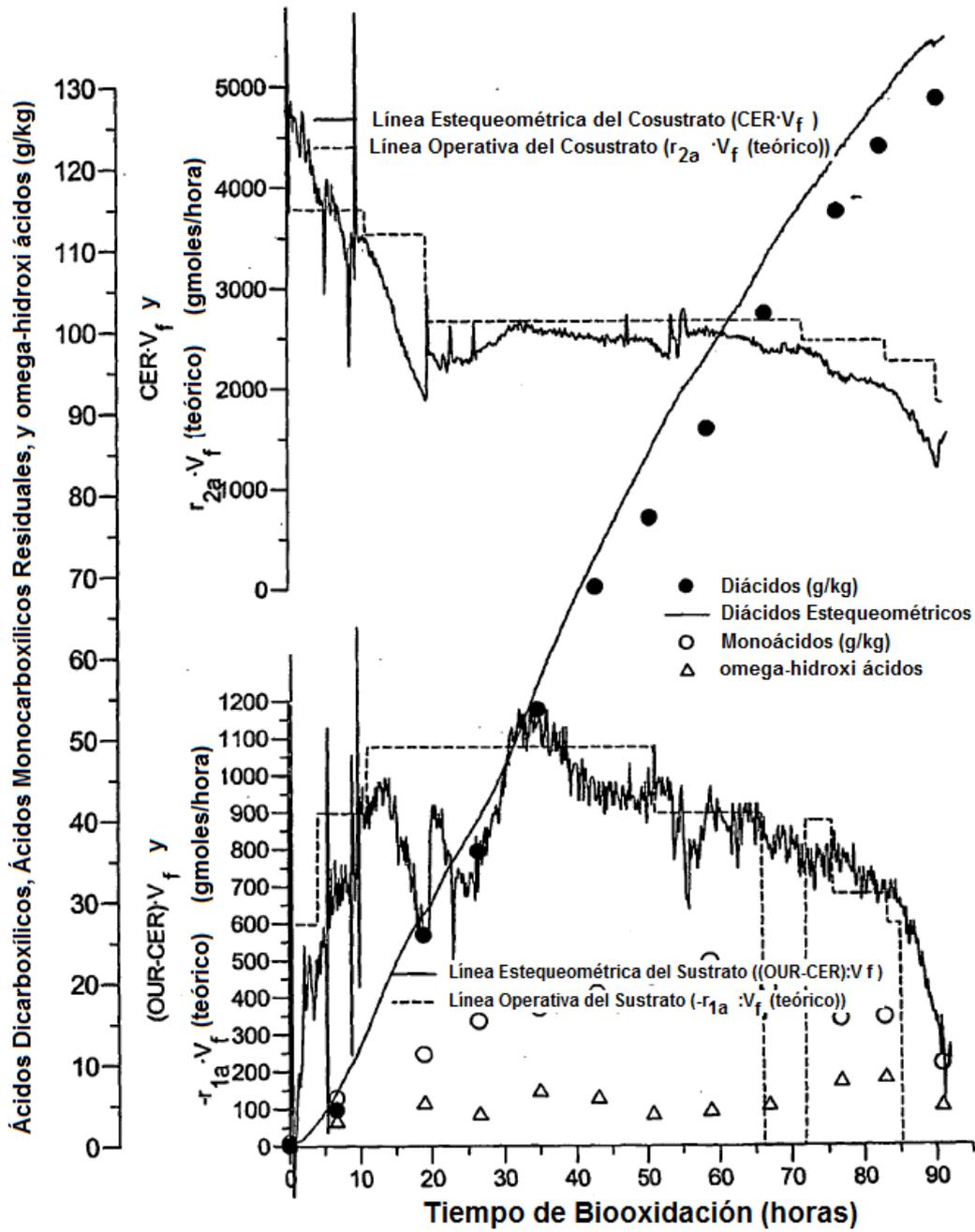


FIGURA 10

