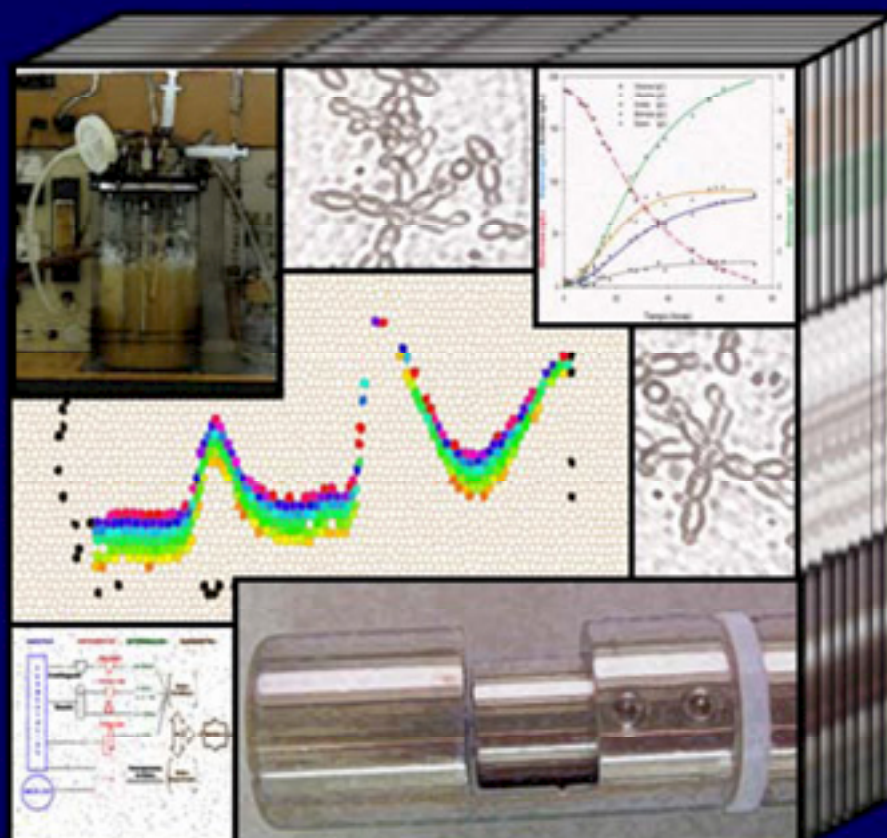


UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Aplicación y Desarrollo de Técnicas Quimiométricas para el Seguimiento de Fermentaciones Alcohólicas



Antonio Clodoaldo Peinado Amores

Diciembre 2005



Universitat Autònoma de Barcelona

**Aplicación y Desarrollo de Técnicas
Quimiométricas para el Seguimiento de
Fermentaciones Alcohólicas**

Antonio Clodoaldo Peinado Amores

Tesis Doctoral. Diciembre 2005

Dr. Marcelo Blanco Romia, catedrático de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado

"Aplicación y Desarrollo de Técnicas Quimiométricas para el Seguimiento de Fermentaciones Alcohólicas"

que constituye la memoria presentada por **Antonio Clodoaldo Peinado Amores** para aspirar al grado de doctor en Química Analítica, ha estado realizado bajo mi dirección y recoge, desde mi punto de vista, los requisitos exigidos para este tipo de trabajos.

Para que quede constancia, firmo el presente certificado a veinticuatro de Octubre de 2005

Dr. Marcelo Blanco Romia

AGRADECIMIENTOS

Afortunadamente, después de haber estado escribiendo un documento estructurado, formal y reglado; llegó la hora de concluirlo y que mejor manera de acabarlo que haciendo balance y recordando a todas las personas que, de una forma u otra, lo han hecho posible... ¡Ardua tarea!

Al escribir estas letras reconozco la suerte que he tenido al coincidir con varias promociones de compañeros que han pasado por el departamento. De ellos y con ellos he aprendido y compartido muy buenos momentos. Desde los más antiguos: Queta, Ramón, Trini, Ignacio, Marta, Agus, Isma, Nuria(s), Miguel, a los que empezaron conmigo, Dámaris y Manel, y a los que se incorporaron más tarde, Susana, Idoia, Jose, Mar, Miguel, Victor, Mari, Ana, Jordi, Quim, Miriam, Carlos...

Igualmente, he de agradecer a los profesores del grupo: Hortensia, Jordi y Santi su disponibilidad e interés en mi trabajo.

Obligatorio es mencionar a las chicas del departamento de Microbiología Nuria V., Nuria, Isabel, Olga y a su jefe, Jordi, ha sido un placer trabajar con vosotros, gracias por recibirme siempre con vuestra mejor sonrisa.

Me siento afortunado por haber podido conocer, en su ámbito de trabajo, a investigadores conocidos y reconocidos que me sorprendieron, no sólo por su capacidad sino también por su respeto y humildad, Anna, Paul, Frans, Rasmus.

El contacto con mis amigos ha hecho que la estancia lejos de casa sea más llevadera, Susana, Carlos, Lola y Jesús y, sin dejar atrás, a los que me hacen sentir que Barcelona también es mi casa, Quim, Manel, Fernando, Eva.

A mi familia, abuela, padres y hermanos gracias por vuestro apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Blanco, le agradezco la oportunidad que me ha dado para realizar este trabajo y lo que he aprendido de él.

"Keep on the lookout for novel ideas that
others have used successfully.
Your idea has to be original only in its
adaptation to the problem you're working on"

Thomas Alva Edison (1847-1931)

"If the Truth is dynamic; how will it ever be found?"

Maksim Gorki (1868-1936)

ABSTRACT

Although alcoholic fermentation is well-known and has been used to the benefit of mankind for more than 9000 years; it is still an important topic of research, not only in the food and beverages industry, but also in the fuel sector, due to the feasibility of using it as an ecological, renewable and alternative source of energy in contrast to fossil fuels.

To optimize the production of ethanol a monitoring strategy is needed to keep the process under control. Within this framework lies this PhD thesis with the **main objective of establishing an in-line analytical methodology to follow the alcoholic fermentation process**. Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) has been selected as the analytical instrument used to obtain in-line information. To extract useful information from NIR spectra different chemometric approaches have been used. Some of them are widespread algorithms and have been largely contrasted, such as PLS (Partial Least Squares). Others have a high potential, such as MCR-ALS, nevertheless they have never been applied to extract useful information from alcoholic fermentation processes.

In order to accomplish the main purpose, the following steps have been developed:

1. The first step was to establish different methodologies for the determination of the main species involved in the alcoholic fermentation process. Glucose consumption and ethanol formation were enzymatically determined using a UV-VIS (UltraViolet- VISible) detector coupled to a FIA (Flow Injection Analysis) manifold. Biomass accumulation in the culture medium was determined as dry weight method. The formation of glycerine was determined by Gas Chromatography and the progressive acidification of the system was determined by titration. The cited methodologies above provided analytical information that was used as the "foundation" to build the calibration models.
2. Fermentation monitoring was carried out using a NIR instrument furnished with different at-line and in-line modules. In this way, the evolution of the fermentation process was registered and stored as NIR spectra.

3. Partial Least Squares (PLS) was used to correlate the analytical and spectral information, thus, calibration models were obtained for the five key species. These models were externally validated and, consequently, were qualified to monitor the fermentation process.
4. After the construction of PLS models, the feasibility of applying resolution algorithms to unravel the information stored in the spectral data set was checked. MCR-ALS is a powerful tool with low demanding needs in terms of analytical reference information. It turned out that MCR-ALS provided good resolution profiles for glucose, ethanol and biomass.
5. Despite the results obtained with MCR-ALS, a further step was given in order to reduce the inherent ambiguities of the resolution algorithms. In that way, different empirical fermentation models were tested. The model with the higher descriptive ability was selected. The information provided by this model was incorporated into the p-ALS algorithm as an input, in the way of equality constraints. This procedure allowed us to unravel the evolution of the fermentation processes carried out at different conditions of temperature and initial pH. Good results were obtained in terms of determination coefficient between the values provided by PLS and those obtained with MCR-ALS.
6. To finish this work, the effect of temperature in polar liquids was studied. In the above described work, temperature has either been implicitly modelled or its distorted effects have not significantly altered the performance of the models. Yet, it is well known that temperature dramatically affects the performance of calibration models in a negative way when it is not controlled. To solve that problem, an ensemble strategy has been proposed. The method combines the advantages of PARAFAC and MLR to minimize the effect of temperature. PARAFAC is used as a variable reduction method to extract the components that are mainly related to the chemical species but also with the physical effect induced by temperature. MLR is used as a calibration method based on the information provided by PARAFAC and on the reference values. The proposed method was applied to different data sets. The goodness of the figures of merit obtained enables us to state that the effect of temperature was corrected, even in situations of interpolation and extrapolation.

INDICE GENERAL

CONTEXTUALIZACIÓN

Historia de las fermentaciones	3
Fermentación alcohólica. Presente y futuro	4

OBJETIVOS

1.1. Objetivos	11
1.2. Estructura	12

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

2.1. Introducción	15
2.2. Clasificación de las levaduras	15
2.3. Rutas metabólicas	17
2.3.1 Respiración	19
2.3.2 Fermentación Glicero-Pirúvica	20
2.4. Factores que afectan la evolución de los procesos fermentativos	23
2.4.1 Temperatura	23
2.4.2 Aireación	25

ESPECTROSCOPIA NIR

3.1. Introducción	29
3.2. Fundamentos de la técnica	31
3.2.1 Origen de la Absorción	31
3.2.2 Oscilador Armónico-Anarmónico	34
3.2.3 Absorción de las bandas en el NIR	38
3.2.4 Instrumentación	40
3.3. Aplicaciones NIR en el control de procesos	44
3.3.1 Apliaciones NIR en el control de Bioprocesos	47

QUIMIOMETRÍA

4.1. Introducción	53
4.2. Etapas del proceso de desarrollo de modelos	54
4.3. Herramientas quimiométricas multivariadas	56
4.3.1 Regresión Lineal Múltiple (MLR)	56
4.3.2 Análisis en Componentes Principales (PCA)	57
4.3.3 Regresión en Componentes Principales (PCR)	63
4.3.4 Regresión Parcial en Mínimos Cuadrados (PLS)	64
4.3.4.1 Evaluación de resultados	67
4.3.5 Métodos de Resolución	68
4.3.6 Métodos Empíricos de Modelado	74
4.3.7 Uso conjunto de Modelos Empírico y de MCR-ALS	79
4.3.8 Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC)	81
4.3.9 Uso conjunto de modelos PARAFAC y MLR	82

METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

5.1	Introducción	87
5.2	Metodología experimental	88
5.2.1	Establecimiento de un proceso fermentativo	88
5.2.1.1	Seguimiento en discontinuo	88
5.2.1.2	Seguimiento en continuo	90
5.2.2	Sistemas para estudiar el efecto de la temperatura en la capacidad predictiva de los modelos	93
5.2.2.1	Sistema en continuo	93
5.2.2.2	Sistema en discontinuo	95
5.2.3	Métodos analíticos de referencia	97
5.2.3.1	Determinación de acidez	97
5.2.3.2	Determinación de glicerina	98
5.2.3.3	Determinación de biomasa	99
5.2.3.4	Determinación de glucosa y etanol	100
5.2.3.4.1	Interacción entre analitos	100
5.2.3.4.2	Cuantificación de glucosa	102
5.2.3.4.3	Cuantificación de etanol	105
5.3	Resultados	108
5.3.1	Análisis de Espectros	108
5.3.1.1	Sistema fermentativo	108
5.3.1.2	Efecto de la temperatura en los espectros NIR de líquidos polares	113
5.3.2	Modelos PLS utilizados en el seguimiento de fermentaciones alcohólicas	115
5.3.3	Modelos MCR-ALS	119
5.3.3.1	Introducción	119
5.3.3.2	Establecimiento del número de componentes	120
5.3.3.3	Restricciones aplicadas	121
5.3.3.4	Predicciones MCR-ALS	123
5.3.4	Uso conjunto de MCR-ALS y modelos empíricos	127
5.3.4.1	Introducción	127
5.3.4.2	Selección del modelo empírico	128
5.3.4.3	Cálculo de las restricciones espectrales de igualdad	130
5.3.4.4	Construcción del Modelo p-ALS	132
5.3.4.5	Validación del Modelo p-ALS	132
5.3.5	Modelos PARAFAC-MLR	137
5.3.5.1	Introducción	137
5.3.5.2	Conjuntos de datos in-line	138
5.3.5.2.1	Descripción de los resultados PARAFAC	138
5.3.5.2.2	Modelos PARAFAC-MLR	142
5.3.5.3	Conjunto de datos at-line	143
5.3.5.3.1	Modelos PARAFAC-MLR	144
6.1	Conclusiones	149

ANEXOS

- Anexo I.** Analytical Monitoring of Alcoholic fermentation using NIR Spectroscopy.
- Anexo II.** Elucidating the compositional profile of Alcoholic fermentation by use of ALS.
- Anexo III.** Monitoring fermentation by joint use of soft- and hard- modelling methods.
- Anexo IV.** Temperature-induced variation for NIR tensor-based calibration.

CONTEXTUALIZACIÓN

HISTORIA DE LAS FERMENTACIONES	3
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. PRESENTE Y FUTURO	4

HISTORIA DE LAS FERMENTACIONES

La fermentación es el proceso más antiguo a través del cual el hombre ha utilizado los microorganismos en su provecho, ya que acontece de una forma natural en semillas, frutos, zumos, leche y otros líquidos orgánicos. Algunos historiadores como el profesor Hugh W. Salzberg en su libro "*From caveman to chemistry*" [1], expone que los jugos fermentados y los derivados lácteos debían de ser utilizados por el hombre no mucho tiempo después del inicio del desarrollo de la agricultura. El reciente hallazgo arqueológico de una vasija con restos fermentados de una bebida mezcla de arroz, miel y fruta en la ciudad de Jiahu en China con una antigüedad alrededor de unos 7000 años (a.C.) apoya esta hipótesis [2].

En Occidente, la referencia más antigua a la fermentación alcohólica se encuentra en unas tablas de arcilla escritas en lenguaje sumerio y cuya antigüedad se remonta a 4.000 años (a.C.). En ellas se revela una fórmula de elaboración casera de la cerveza: "...Se cuece pan, se deshace en migas, se prepara una mezcla en agua y se consigue una bebida que transforma la gente en extrovertida y feliz". Los egipcios, recogiendo los métodos sumerios, elaboraron una cerveza que bautizaron con el nombre de "zythum", descubrieron la malta y usaron azafrán, miel, jengibre y comino para proporcionarle aroma y color.

Respecto a la fermentación vínica, en tumbas egipcias datadas en la tercera dinastía, 2700 años (a.C.), diversos textos recogen como el vino era conocido y consumido por faraones y sacerdotes mientras que la cerveza aliviaba la sed de los trabajadores.

En la época de la república romana, Lucius Columela, *Hispania Baetica*, 65 (a.C.), en su tratado "*De Re Rustica*" [3] describió exhaustivamente el método de vinificación y los problemas que podían surgir durante el transcurso de ésta.

[1] Salzberg H.W. "*From Caveman To Chemist: Circumstances and Achievements*", 1991, Ed. American Chemical Society.

[2] Mc Groger P., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall. G. "Fermented beverages of pre- and proto-historic China", *Proceed. of the Natural Acad. of Sciences Unit. Stat. Amer.*, 2004, 101(51) 17593-17598.

[3] Columella L., "*De Re Rustica I –IV* ", translated by Ash H.B., "*On Agriculture*", 1941, Ed. Heinemann.

Desde entonces, la producción de alcohol fue considerada como una "artesanía" hasta que en 1810, el químico Gay-Lussac demostró que la glucosa era la base para la producción de etanol.

El papel de las levaduras en la fermentación no fue claramente establecido hasta 1837. El microbiólogo Pasteur descubrió que el proceso requiere la ausencia de aire y además que el rendimiento alcohólico se reduce con su presencia y bautizó a este proceso como fermentación (del latín *fervere*, hervir) para distinguirlo de aquellos que requieren oxígeno.

En 1838 el naturalista alemán Schwann demostró que la temperatura y ciertos productos químicos eran capaces de parar la fermentación alcohólica y llamó a la levadura *zuckerpilz*, que significa hongo de azúcar, *Saccharomyces* en latín.

En 1897, Buchner descubrió que se podía completar las fermentaciones usando extractos de levaduras. Esto llevó al descubrimiento, en los 40 años siguientes, de las diferentes enzimas que producen la conversión del etanol en glucosa.

Según Streinkraus [4], las fermentaciones han sido utilizada por el hombre desde que adoptó el sedentarismo por cuatro razones fundamentales:

1. Enriquecimiento de los alimentos a través del desarrollo de una gran diversidad de aromas y texturas.
2. Preservación de los alimentos.
3. Enriquecimiento de alimentos con substratos biodisponibles tales como aminoácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.
4. Destoxificación de alimentos.

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA. PRESENTE Y FUTURO

Actualmente, la fermentación alcohólica genera el 97% del etanol producido a nivel mundial ya que es más viable técnica y económicamente que la síntesis química a través de la oxidación del etileno.

[4] Streinkraus, K.H., "Handbook of Indigenous Fermented Food", 1995, Ed. Marcel Dekker (New York).

Si atendemos a las cifras de producción de etanol de los últimos 30 años, se observa como la tendencia en la producción de etanol ha sido de crecimiento y expansión, ver figura 1. Considerando el uso final de la producción, se aprecia como en 1975 la mayor parte del etanol producido tenía como destino final un uso industrial y alimentario. A partir de este momento, sin embargo, empieza a cobrar importancia la utilización de etanol para la producción de carburantes. Veinticinco años más tarde, en el año 2000, el 68% del total de etanol producido se empleó en la industria de carburantes, mientras que el uso industrial y el alimentario descendieron al 21% y al 11% respectivamente. Según la F.O. Licht, las previsiones mundiales de producción de etanol para uso industrial y alimentario en el año 2010 se mantendrán en la misma tónica con respecto al etanol producido en el 2001, sin embargo, el etanol utilizado en la industria de carburantes en el año 2010 rondarán los 56 Gigalitros, esto supone alrededor de un 175% de incremento respecto a la producción del año 2001 que fue de 20.3 Gigalitros [5].

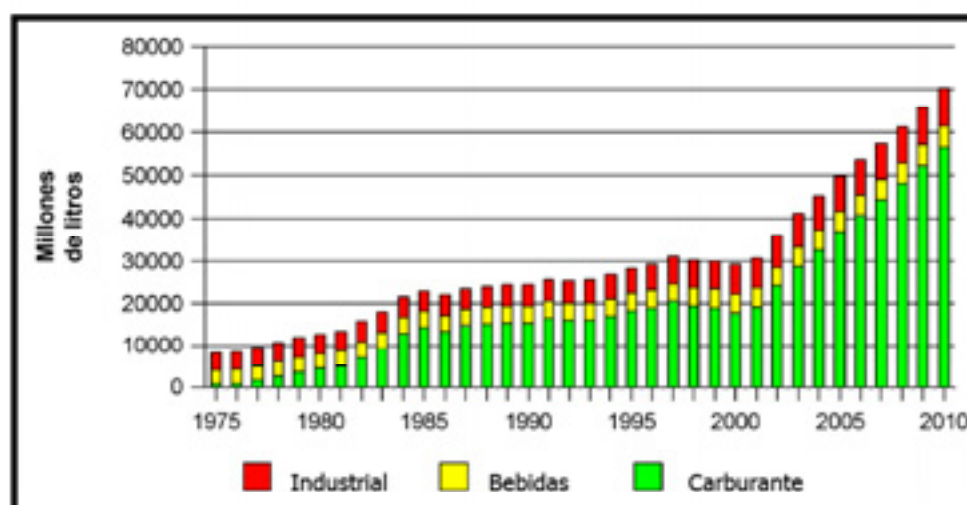


Figura 1: Producción Mundial (millones de litros) y previsiones de Bioetanol.

Por países, figura 2, Brasil es el estado que más bioetanol produce ya que es uno de los principales productores mundiales de biomasa fermentable en especial de caña de azúcar, (338 millones de toneladas), además el gobierno carioca viene fomentando desde los años 70 políticas y programas pro-alcohol

[5] Berg C., "World Ethanol Markets, Analysis and Outlook". 2004, Ed. F.O. Licht's.

para la utilización del etanol como combustible. Aunque también hay que resaltar que si estas previsiones de crecimiento se cumplen, para el año 2006, EEUU podría ponerse por delante de Brasil con una producción de etanol de 13.2 Gigalitros. Actualmente en Asia y Europa la producción de bioetanol es baja con respecto a la producción de Brasil y EEUU, pero se prevé un incremento en la producción de bioetanol del 860% para el año 2006.

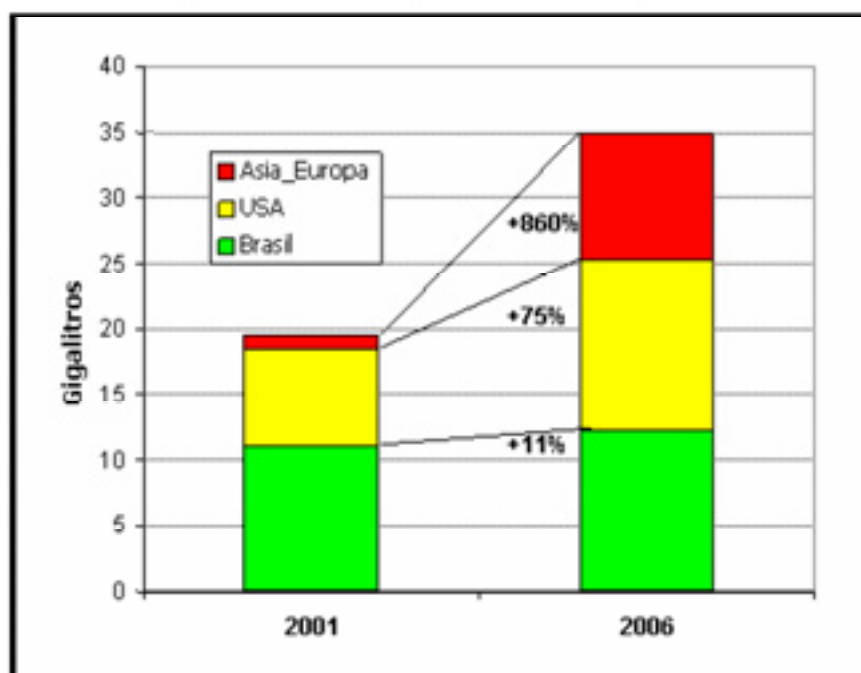


Figura 2: Producción Mundial (2001) frente a Previsiones (2006) de Bioetanol.

El porqué de estos considerables incrementos en la producción de etanol para uso como combustible tiene razones claramente justificables desde un punto de vista **Industrial, Económico, Ambiental y Social**.

Desde un punto de vista **Industrial**, el etanol se aplica en una gran variedad de procesos diferentes tales como la fabricación de ésteres, detergentes, pinturas, lacas, colas, barnices, explosivos, cosméticos y en la industria alimentaria y farmacéutica.

La utilización del etanol en la elaboración de combustibles ecológicos, ya sea como antidetonante o bien como agente combustible, presenta considerables ventajas técnicas; el calor de combustión del etanol es un 34% menor que el de la gasolina, sin embargo, tiene propiedades de combustión mejores. La temperatura

de llama del etanol es 1930°C, que es menor que la de la gasolina, (1977°C) y la del diesel (2054°C), por eso las pérdidas por radiación son menores, además, arde más rápidamente una vez iniciada la ignición por lo que el par motor conseguido es más eficiente. Igualmente, el etanol tiene un número de octano de 113, lo que permite que la relación de compresión en un motor de gasolina se incremente entre 9 y 12 veces, esto supone una mejora de entre el 6% y el 10% en el valor teórico de eficiencia térmica. En términos prácticos, mezclas de etanol en gasolina comprendidas entre un 3% y un 22% no suponen grandes modificaciones del motor.

Desde un punto de vista **Económico** [6], aunque el mercado del etanol es aún pequeño, la importancia creciente del bioetanol hace pensar en el futuro desarrollo de mercados globales, donde se establezcan mecanismos de intercambio que estabilicen el mercado en situaciones de escasez temporales o regionales. Igualmente, hay que resaltar el desarrollo de políticas estratégicas a nivel gubernamental, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo que fomentan, a través de primas y de reducciones de impuestos, la producción de etanol a partir de la fermentación de productos diversos tales como tubérculos, melazas, frutas, suero, celulosa, residuos de cosechas y otras muchas fuentes.

Desde un punto de vista **Social**, no hay que olvidar que el etanol es una fuente de energía renovable y como tal, sujeta a la meteorología, a diferencia del gas o el petróleo. Es por eso que las políticas pro-alcohol suponen un soporte y diversificación en la renta agraria, tan dependiente de los vaivenes climáticos.

Desde un punto de vista **Medioambiental** y de acuerdo con el protocolo de cambio climático de Kyoto (1997) [7], la mayor parte de los países desarrollados se comprometieron a disminuir las emisiones netas de CO₂. Un progresivo incremento en el uso de bioetanol como combustible de transporte serviría para cumplir este compromiso, además, las emisiones de compuestos orgánicos volátiles y de NO_x son significativamente menores en comparación con las producidas con el uso de combustibles fósiles.

[6] Berg C., "World Ethanol Production and Trade to 2000 and beyond", 1999, Ed. F.O. Licht's.

[7] <http://www.mtnforum.org/resources/library/kpunf98a.htm>, 2005.

1

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS.....	11
1.2 ESTRUCTURA.....	12

1.1 OBJETIVOS

Tal y como se ha expuesto en la introducción, a pesar de que la fermentación alcohólica es conocida y utilizada por el hombre desde hace más de 9000 años, en la actualidad, la producción de etanol está en pleno proceso de crecimiento y expansión impulsada por la industria de biocombustibles. Como consecuencia, se está convirtiendo en un campo de interés e intensa investigación a todos los niveles de su proceso productivo y es en este contexto donde se enmarca el presente trabajo.

El objetivo general de esta tesis es la **aplicación en continuo de metodologías analíticas basadas en la combinación de medidas espectroscópicas de infrarrojo cercano (NIR) con métodos quimiométricos de análisis multivariante**. Para ello se han desarrollado aplicaciones enfocadas a la determinación cuantitativa y al seguimiento de las principales especies que intervienen en el proceso de fermentación realizado por *Saccharomyces cerevisiae*.

El objetivo general anunciado se puede desglosar en los siguientes objetivos secundarios:

1. Establecer métodos analíticos de referencia para la determinación de los analitos principales que intervienen el proceso de fermentación alcohólica.
2. Establecer un proceso de fermentación alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae* y registrar su evolución mediante técnicas espectroscópicas de infrarrojo cercano (NIR).
3. Desarrollar modelos inversos de calibración multivariados basados en las medidas espectroscópicas y en los valores analíticos de referencia asociados a éstas.
4. Desarrollar modelos de resolución basados en medidas espectroscópicas de infrarrojo cercano.
5. Aplicar los modelos obtenidos al estudio de fermentaciones realizadas en diferentes condiciones de temperatura y pH inicial.

6. Estudiar la influencia de la temperatura en la robustez de los modelos multivariados y desarrollar un método de calibración para minimizar su efecto.

1.2 ESTRUCTURA

Esta memoria está estructurada en los siguientes capítulos:

- Los tres primeros capítulos introducen las ideas básicas de los temas tratados en esta tesis: los aspectos generales de la fermentación alcohólica (capítulo segundo), de la espectroscopia en el infrarrojo cercano (capítulo tercero) y de las herramientas quimiométricas utilizadas para extraer la información contenida en los espectros para poder construir los modelos que permitan caracterizar las fermentaciones en cada momento (capítulo cuarto).
- El capítulo quinto muestra un resumen global de la metodología empleada y los resultados más relevantes obtenidos en aras de la consecución de los objetivos planteados. Las conclusiones extraídas, en relación a los resultados obtenidos, se encuentran recogidas en el capítulo seis.
- Por último los anexos finales recogen los artículos publicados relacionados con el trabajo presentado.

La bibliografía está situada a pie de página porque considero que de esta forma se facilita la lectura y el estudio.

2

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

2.1 INTRODUCCIÓN	15
2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS	15
2.3. RUTAS METABÓLICAS.....	17
2.3.1 Respiración.....	19
2.3.2 Fermentación Glicero-Pirúvica.....	20
2.4 FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS QUE AFECTAN LA EVOLUCIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS	23
2.4.1 Temperatura	23
2.4.2 Aireación.....	25

2.1 INTRODUCCIÓN

La fermentación de jugos vegetales es un proceso microbiano global y complejo en el cual están implicados levaduras, bacterias, hongos y sus respectivos virus, siendo la fermentación alcohólica la ruta metabólica más importante en la cual las levaduras juegan un papel clave. Para entender la fermentación alcohólica es esencial conocer:

- La identidad taxonómica de las levaduras que contribuyen a la fermentación.
- El conjunto de rutas metabólicas relacionadas con la degradación de azúcares y la formación de etanol.
- La influencia de los parámetros externos, tales como temperatura y aireación, que afectan la reacción.

2.2 CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

Las levaduras constituyen un grupo de hongos unicelulares y taxonómicamente heterogéneos y muy complejos. No son una entidad taxonómica natural, aunque guardan una uniformidad morfológica. Figura 2.1.

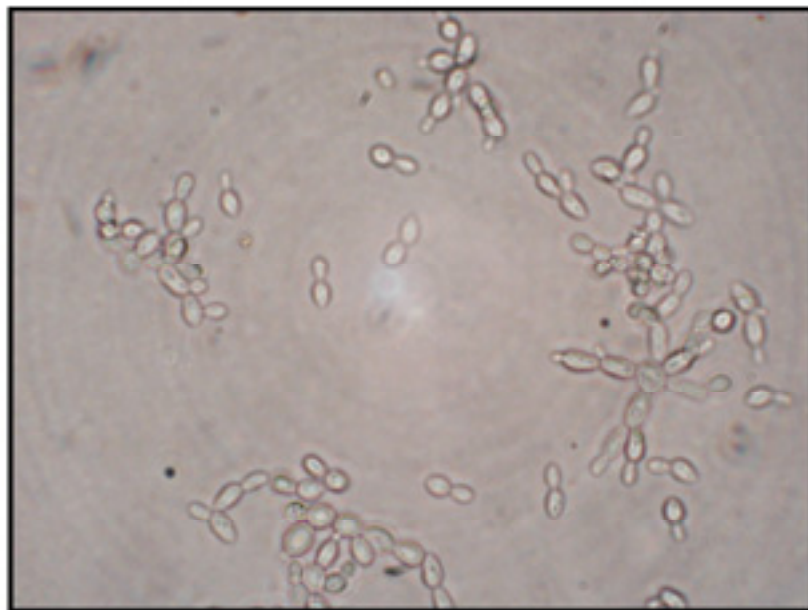


Figura 2.1. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* en gemación.

Hay aproximadamente unas 500 especies de levaduras, separadas en unos 39 géneros [1]. En comparación con otros grupos de microorganismos, las levaduras son pocas, ya que las algas, las bacterias y los protistas suman varios miles de especies.

Las levaduras igual que los mohos son hongos, pero se distinguen de los mohos por ser unicelulares, y por crecer y reproducirse más rápidamente. En relación a su peso, son más aptas para efectuar cambios químicos porque tienen mayor área superficial en relación a su volumen.

Son diferentes de las algas porque no realizan fotosíntesis y diferentes a los protozoos ya que poseen pared celular rígida.

La clasificación y nomenclatura de las levaduras han sufrido numerosos cambios desde el principio de los estudios taxonómicos. La clasificación de Kreger-Van Rij [2] en base a los porcentajes de citosina y guanina en el DNA y justificada en los estudios de Yarrow y Nakase [3] cambió de una manera importante la nomenclatura de las especies de *Saccharomyces*. De las cuarenta y una especies que se conocían de *Saccharomyces*, diecisiete se agruparon bajo el específico *cerevisiae* y, en lugar de ser consideradas como especies, se clasificaron como variedades fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*, tabla 2.1.

Dentro de la gran variedad existente dentro de la especie *cerevisiae*, podemos establecer algunas características comunes. La morfología suele ser elipsoidal con un eje mayor de aproximadamente $2.5 \mu\text{m}$ y un eje menor de $1.5 \mu\text{m}$ [4]. Su peso aproximado es de 60×10^{-12} gramos y poseen un volumen de aproximadamente $70 \mu\text{m}^3$.

Se reproducen tanto vegetativamente como sexualmente. Vegetativamente lo hacen por medio de gemación, la duración está comprendida entre una y dos horas y cada célula puede reproducirse entre 20 y 30 veces. Sexualmente lo hace

[1] Fleet G.H., "Wine Microbiology and Biotechnology", 1994, Ed. Harwood Academic Publishers.

[2] Kregger Van Rij N.J.W., "The Yeast a Taxonomic Study", 1984, Ed. Elsevier Science Publishers.

[3] Yarrow D., Nakase T., "DNA base composition of species of the genus *Saccharomyces*", *Antonie van Leeuwenhoek*, 1975, 41 81-88.

[4] Pelczar M., Rejn R., Chan S., "Microbiología", 1982, Ed. McGraw Hill.

Fermentación Alcohólica

a través de ascoesporas, aunque no suele esporular fácilmente y a menudo las esporas producidas no suelen ser viables.

Presentan un nicho ecológico muy extendido, se encuentran en el suelo, en las superficies vegetales y en el tracto digestivo de los animales. El viento y los insectos se encargan de diseminarlas. Su papel clave en la fermentación alcohólica se debe a cuatro parámetros fundamentales: su crecimiento en anaerobiosis, su resistencia a los sulfitos y al etanol y su capacidad para crecer en ambientes de elevada osmolaridad [5].

	Fermentación					
	D-Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Rafinosa	Maltobiosa	Amidón
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
var. <i>aceii</i>	-	-	-	-	-	-
var. <i>bayanus</i>	-	+	+	+	-	-
var. <i>capensis</i>	-	+	-	+	-	-
var. <i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-
var. <i>chebaleri</i>	+	+	-	+	-	-
var. <i>coreanus</i>	+	+	-	+	+	-
var. <i>diastolicus</i>	+	+	+	+	-	+
var. <i>globosus</i>	+	-	-	-	-	-
var. <i>heterogenicus</i>	-	+	+	-	-	-
var. <i>hienpiensis</i>	-	-	+	-	+	-
var. <i>inuitatus</i>	-	+	+	+	+	-
var. <i>norbensis</i>	-	-	-	-	+	-
var. <i>oleaceus</i>	+	-	-	+	+	-
var. <i>oleaginosus</i>	+	-	+	+	+	-
var. <i>prostoserdovii</i>	-	-	+	-	-	-
var. <i>steineri</i>	+	+	+	-	-	-
var. <i>uvarum</i>	+	+	+	+	+	-

Tabla 2.1. Capacidad fermentativa de diferentes variedades fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. RUTAS METABÓLICAS

Dependiendo de la presencia o no de O₂ las levaduras pueden degradar los azúcares por medio de dos rutas metabólicas; la respiración y la fermentación. Ambos procesos comienzan de la misma forma, compartiendo el tronco de la glucólisis, ruta mediante la cual la glucosa es degradada hasta piruvato produciéndose dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada.

[5] Amerine M. A., Berg H. W., Kunkee R. E., Ough C. S., Singleton V. L., Webb, A. D. "The Technology of winemaking", 1980, Ed. AVI Publishing Co. Inc. (Westport).

Fermentación Alcohólica

La ruta metabólica de la glucólisis no se completó hasta 1940 debido en particular a las contribuciones de Embden y Meyerhoff.

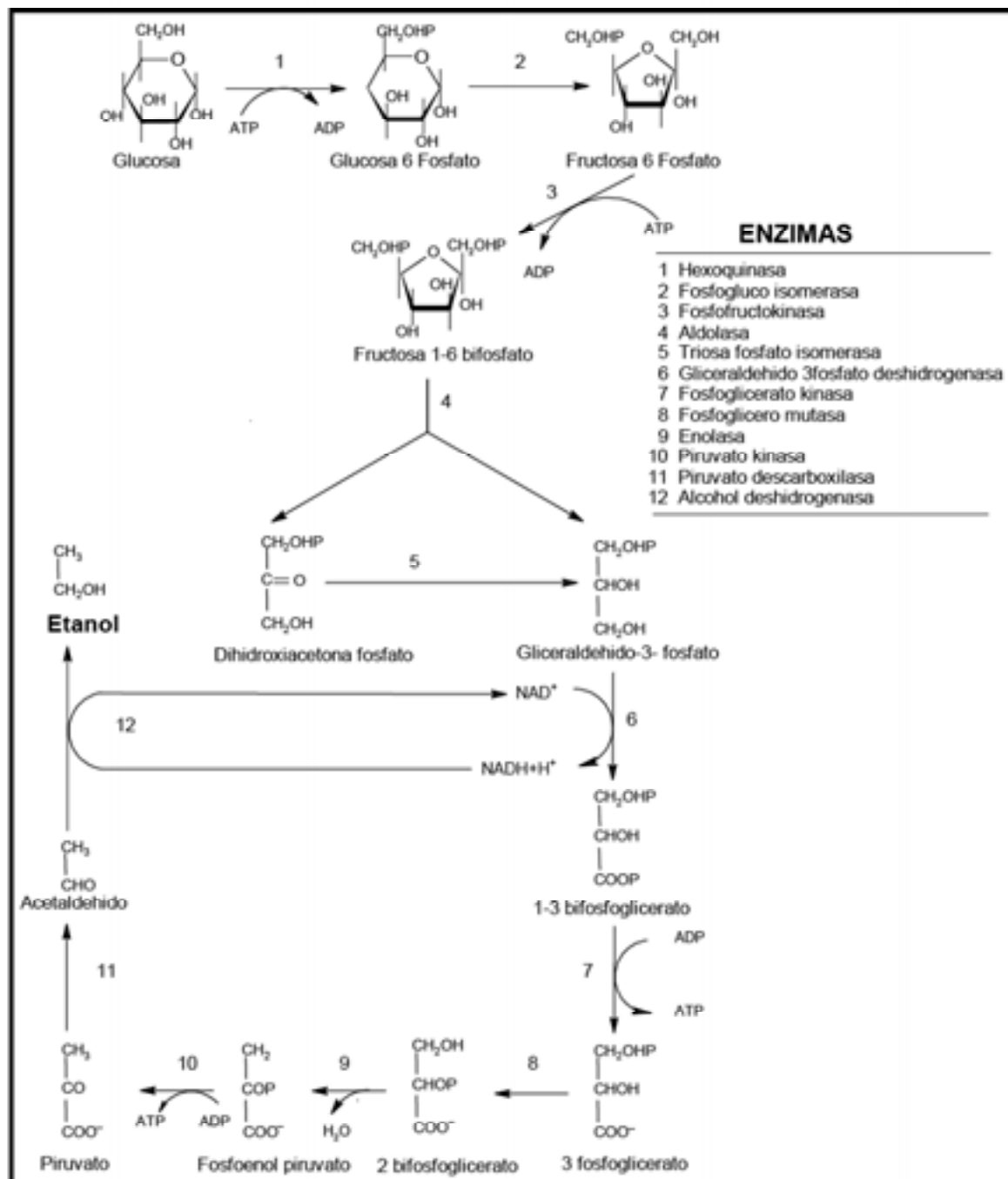


Figura 2.2. Acoplamiento de la glucólisis con la fermentación alcohólica.

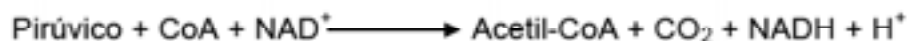
La glucólisis es la única ruta catabólica que posee *Saccharomyces* para metabolizar la glucosa ya que cepas mutantes para el gen de la

fosfoglucoisomerasa no pueden crecer en un medio con glucosa como única fuente de carbono.

El poder reductor NADH producido en la glucólisis debe ser transferido a un aceptor de electrones para regenerar el NAD⁺. En la fermentación alcohólica este aceptor es el acetaldehído, procedente de la descarboxilación del piruvato, que es transformado en etanol. El acoplamiento entre estas dos rutas metabólicas puede verse en la figura 2.2.

2.3.1 RESPIRACIÓN

Durante el crecimiento respiratorio, el ácido pirúvico, originado en la glucólisis, sufre una descarboxilación en presencia de Coenzima-A (CoA) y NAD⁺. Este proceso genera CO₂, NADH y acetil coenzima-A (acetil-CoA), estando catalizado por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa.



El acetil-CoA entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), en el transcurso del cual se descarboxila y se forman seis moléculas de NADH y una de FADH. Estas coenzimas se reoxidan en la cadena de transporte electrónico, siendo el aceptor final de electrones el O₂ que se reduce a H₂O.

Una molécula de glucosa que sigue la ruta respiratoria produce 38 moléculas de ATP, esto supone 19 veces más energía biológicamente utilizable por la levadura que la fermentación alcohólica. Industrialmente la respiración se utiliza para la producción de levadura.

2.3.1.1 Regulación entre la respiración y la fermentación

Pasteur fue el primero en observar que *Saccharomyces* creciendo a bajas concentraciones de glucosa podía utilizar tanto la ruta respiratoria como la fermentativa. La aireación producía un incremento en la biomasa formada y una disminución del etanol producido y de la glucosa consumida. Pasteur dedujo que la respiración inhibía la fermentación.

El "Efecto Pasteur" ha sido interpretado de varias formas:

- Como una inhibición competitiva entre la piruvato deshidrogenasa, enzima respiratoria y la piruvato descarboxilasa, enzima fermentativa.
- Una inhibición por medio del ATP citosólico que afecta en gran medida a la fosfofructoquinasa, con lo que una gran cantidad de hexosas fosfatos se acumulan en el interior de la célula y esto provoca una disminución del transporte de glucosa hacia el interior celular.

Por otro lado, cuando *Saccharomyces* crece a altas concentraciones de azúcares elevadas, toda la glucosa se metaboliza siguiendo una ruta exclusivamente fermentativa, incluso en presencia de oxígeno. Este fenómeno, descubierto por Crabtree [6] en 1929, recibe varios nombres: "represión catabólica de la glucosa", "efecto contrario a Pasteur" o, simplemente, "efecto Crabtree".

Los síntomas que presenta *Saccharomyces* debido a este efecto son los siguientes:

- Degeneración mitocondrial.
- Descenso en la proporción de esteroides y ácidos grasos celulares.
- Represión de la síntesis de las enzimas que forman el ciclo de Krebs y la cadena de transporte electrónico.

En *Saccharomyces* empieza a desarrollarse el efecto Crabtree a concentraciones de glucosa superiores a 9 g/L

2.3.2 FERMENTACIÓN GLICERO-PIRÚVICA

La fermentación glicero-pirúvica es una ruta metabólica que ocurre fundamentalmente al principio de la fermentación alcohólica cuando aún no se han expresado las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, con lo que el etanol no puede ser el aceptor final de electrones. En estas condiciones el NADH producido en la oxidación del gliceraldehido 3-fosfato se utiliza para reducir la dihidroxiacetona a glicerol 3-fosfato, formándose como productos glicerina y piruvato, figura 2.3.

[6] Crabtree H.G., "Observations on the carbohydrate metabolism of tumours", *Biochem. J.*, **1929**, 23, 536-545.

Fermentación Alcohólica

La glicerina se acumula y permanece en el medio, sin embargo, el piruvato es un analito iniciador del cual parten diferentes rutas metabólicas que dan lugar a una gran variedad de compuestos finales, la mayoría de ellos ácidos orgánicos, pero también otros compuestos como: acetona, diacetilo, ácido acético, ácido propanoico o 2,3-butanodiol que, al igual que la glicerina, se acumulan en el medio de cultivo. Ver figura 2.4

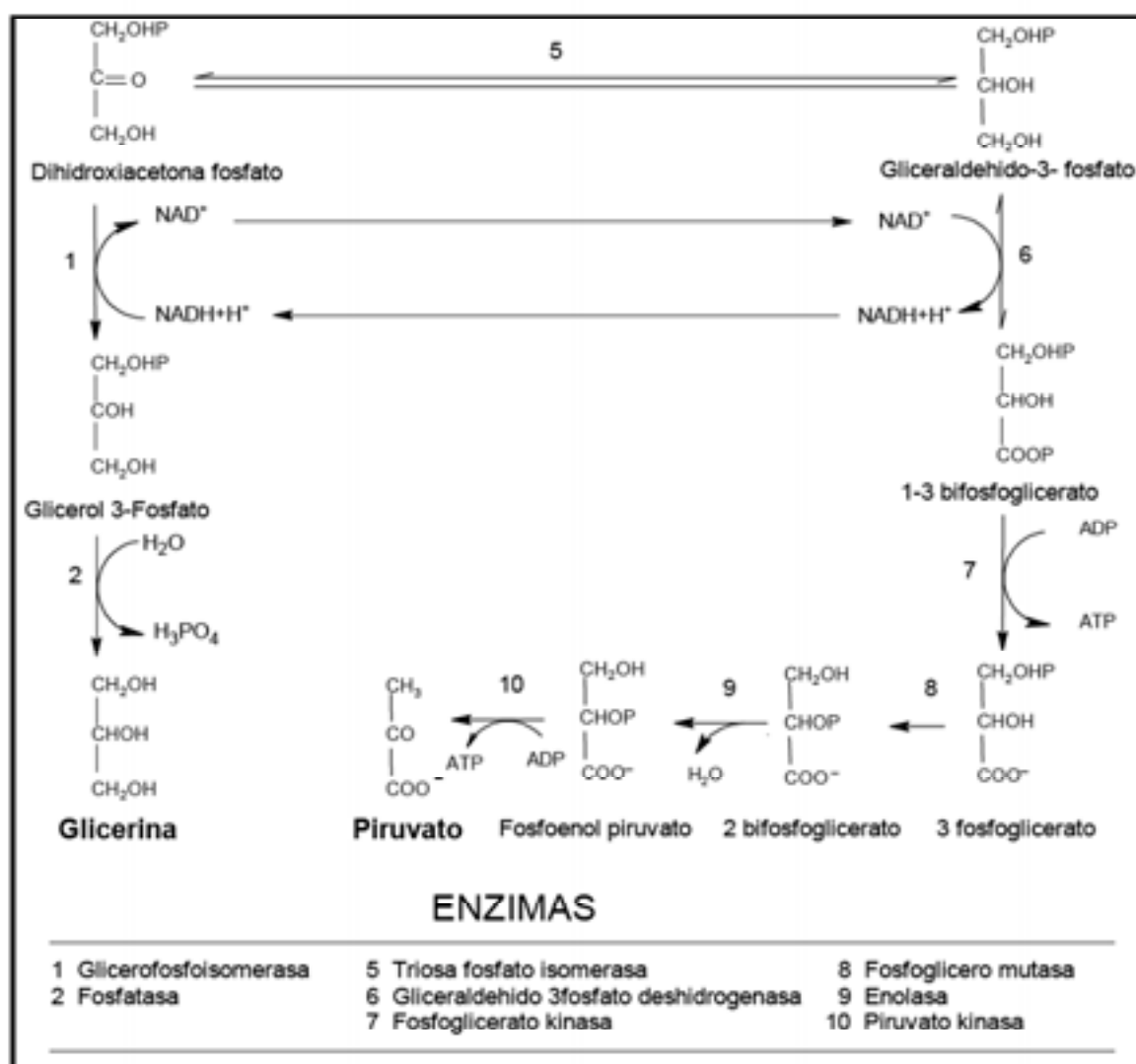


Figura 2.3. Acoplamiento de la glucólisis con la fermentación glicero-pirúvica.

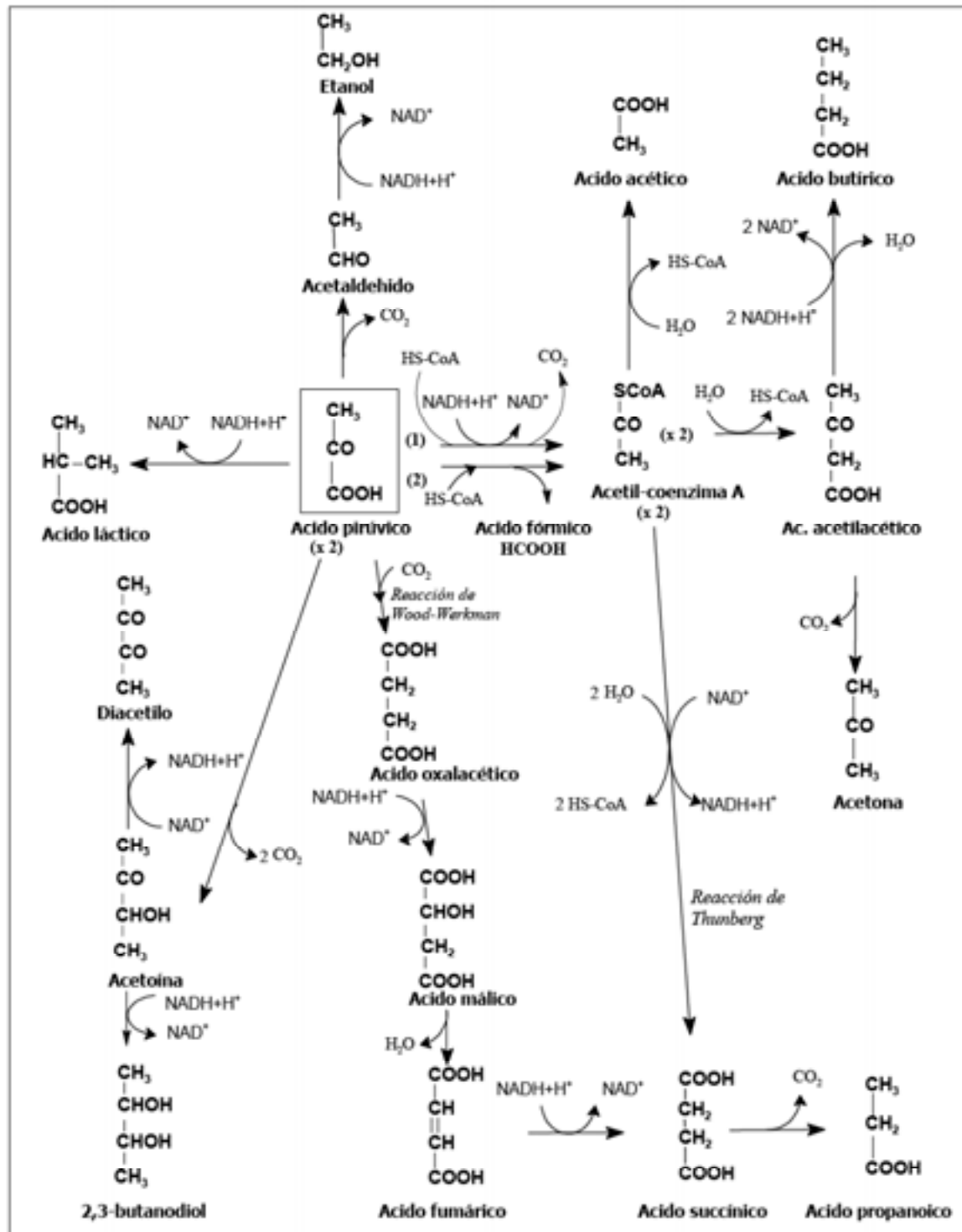


Figura 2.4. Acoplamiento de la glucólisis con la fermentación glicero-pirúvica.

2.4 FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS QUE AFECTAN LA EVOLUCIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS

2.4.1 TEMPERATURA

La fermentación alcohólica presenta la estequiometría global



liberando 40 Kcal/mol. Esta energía es utilizada, en forma de ATP, para cubrir sus funciones vitales. En el proceso se forman 2 moles de ATP, necesitándose 7.3 Kcal por cada mol de ATP formado y, por otra parte, la energía libre no utilizada (40-14.6=25.4 Kcal/mol) se disipa en forma de calor.

Si un caldo de cultivo contiene 180 g/L la energía liberada no utilizada sería suficiente para subir la temperatura de 20 a 45°C. Tal incremento de temperatura mataría la levadura. Afortunadamente, la fermentación no ocurre de manera explosiva sino que tiene una duración de varios días y el calor es disipado por medio del CO₂ liberado, por la evaporación del agua y el alcohol, y por los intercambios a través del fermentador.

La temperatura afecta profundamente la intensidad respiratoria y fermentativa. Por cada aumento de temperatura de 10°C la intensidad de la fermentación se duplica y se hace máxima en torno a los 35°C. Ver tabla 2.2 [7].

Tabla 2.2. Intensidades respiratorias y fermentativas de *Sacharomyces* en función de la temperatura.

Temperatura (°C)	O ₂ Consumido (mm ³ /g de levadura y hora)	CO ₂ Consumido
15	4.20	118
20	6.70	168
25	9.60	229
30	11.40	321
35	6.20	440
40	3.00	376

Además de afectar a la actividad de la levadura, la temperatura también influye en la velocidad de la fermentación. Entre 15°C y 35°C la duración de la fase

[7] Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., "Sciences et Techniques du Vin", 1975, Ed. Dunod (París).

de latencia disminuye y el consumo de compuestos nitrogenados aumenta al incrementarse la temperatura. Por ejemplo, en un caldo de cultivo con una concentración inicial de glucosa de 200 g/L, la fermentación puede durar varias semanas a 10°C, 15 días a 20°C y 4 días a 30°C. Con concentraciones de glucosa superiores la fermentación se ralentiza, pudiendo llegar incluso a detenerse. Ver tablas 2.3 y 2.4 [7].

Tabla 2.3. Periodo de latencia y alcohol obtenido en función de la temperatura. Concentración inicial de glucosa 300 g/L.

Temperatura (°C)	Iniciación de la fermentación	Alcohol Conseguido (% vol)
10	8 días	16.2
15	6 días	15.8
20	4 días	15.2
25	3 días	14.5
30	36 horas	10.2
35	24 horas	6.0

Tabla 2.4 Formación de alcohol en función de la temperatura de fermentación y de la concentración inicial de glucosa.

Concentración de Glucosa (g/L)	Alcohol Potencial (% vol)	Alcohol producido (% vol) a			
		9°C	18°C	27°C	36°C
127	7.2	7.0	6.9	6.9	4.2
217	12.4	11.8	11.0	9.4	4.8
303	17.3	9.9	9.1	7.7	5.1

La influencia de la temperatura en la fermentación queda descrito en la figura 2.5 [8]. A 25°C la fermentación es más lenta pero completa (S_0 = Concentración inicial de glucosa). A 30°C y a 35°C la fermentación es más rápida pero se detiene a una concentración de glucosa S_1 y S_2 respectivamente, por debajo de S_0 . Al aumentar la temperatura también aumenta velocidad inicial de fermentación y disminuye el tiempo de latencia. Si la concentración de glucosa inicial hubiera sido más baja, la fermentación se habría completado a 35°C, por otro lado, si la concentración inicial hubiera sido mayor la fermentación se habría detenido incluso a 25°C.

[8] Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., "Handbook of Enology. The Microbiology of wine and vinifications", 2001, Ed. Wiley (New York).

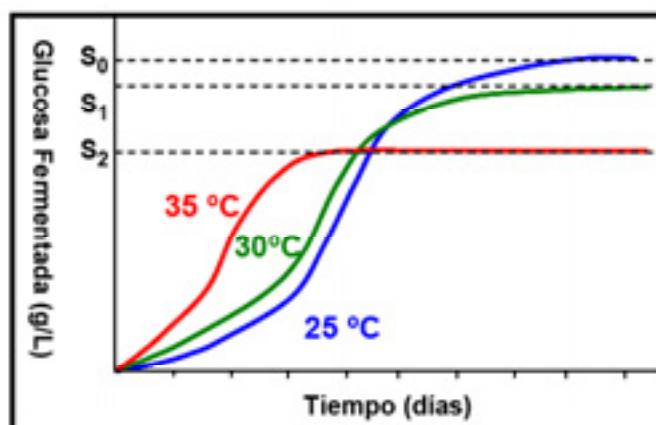


Figura 2.5. Influencia de la temperatura en la cinética de fermentación.

2.4.2 AIREACIÓN

La aireación acelera la fermentación ya que el oxígeno favorece la síntesis de esteroides y de ácidos grasos insaturados que mejoran la permeabilidad de la membrana y consecuentemente la penetración de glúcidos. En la tabla 2.5 se muestra el efecto de una aireación limitada en la cinética de fermentación de un caldo con 270 g/L de glucosa y un inóculo inicial de 10^6 células/ml [9]. En anaerobiosis la fermentación se paró el día 14 dejando 75 g de glucosa/L y la población de levaduras ascendió a 5×10^7 células/ml. En aerobiosis limitada la fermentación se completó totalmente y la población de levaduras se dobló. Si la concentración de azúcares hubiera sido menor la fermentación se hubiera completado en ambos casos, aunque más lentamente en anaerobiosis.

Tabla 2.5 Evolución de un caldo de cultivo según diferentes condiciones de aireación.

TIEMPO	AEROBIOSIS		ANAEROBIOSIS	
	Glucosa	Células	Glucosa	Células
	g/L	10^7 /ml	g/L	10^7 /ml
7 días	86		140	
14 días	2		75	
21 días	2	10.7	75	5
Inóculo Inicial: 10^6 células/ ml			Glucosa inicial: 270 g/L	

[9] Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P., "Traité d'Oenologie Sciences et Techniques du Vin", 1976, Ed. Dunod (París).

3

ESPECTROSCOPIA NIR

3.1 INTRODUCCIÓN	29
3.2 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA.....	31
3.2.1 Origen de la Absorción.....	31
3.2.2 Oscilador Armónico-Anarmónico	34
3.2.3 Absorción de las bandas en el NIR.....	38
3.2.4 Instrumentación	40
3.3 APLICACIONES NIR EN EL CONTROL DE PROCESOS.....	44
3.3.1 Apliaciones NIR en el control de Bioprocesos.....	47

3.1 INTRODUCCIÓN

A pesar del temprano descubrimiento de la radiación en la región del infrarrojo cercano (NIR, *Near-Infrared*) por William Herschel en 1800 [1], el desarrollo de esta espectroscopia para la resolución de problemas en el ámbito de la química analítica ha sido lento. Tuvo que pasar casi un siglo hasta que Abney y Festing registraran fotográficamente el espectro de líquidos orgánicos en la región espectral entre 700 y 1200 nm [2]. Posteriormente, durante la primera mitad del siglo XX, el interés de los espectroscopistas por la región infrarroja se centraba en la región del infrarrojo medio, prestando poca atención a la zona vecina al visible, convencidos del poco interés de esta región para fines analíticos.

En la década de los 50, con la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales equipados con detectores fotoeléctricos capaces de registrar espectros en la zona del infrarrojo cercano, se desarrollaron las primeras aplicaciones en las que intervenía esta espectroscopia.

Una etapa muy importante para la técnica fue la década de los 70; un grupo del Ministerio de Agricultura de los EEUU, USDA (*United States Department of Agriculture*), liderado por Karl Norris empezó a utilizar esta metodología para el estudio de muestras en el ámbito de la agroalimentación [3-4]. A partir de ese momento, el interés por la espectroscopia NIR experimentó un cambio substancial.

Hasta finales de los años 70 los instrumentos comerciales fueron principalmente instrumentos de filtros diseñados para aplicaciones específicas. Después de esta etapa inicial y con la llegada de la era digital, los avances en el diseño y desarrollo de nueva instrumentación, con una electrónica más estable y con ópticas mejoradas, permitieron registrar espectros de manera rápida y

[1] Herschel W., *Phil., Trans. Roy. Soc.*, **1800**, Part II, 284-292.

[2] Abney W., Festing E.R., *Phil., Trans. Roy. Soc.*, **1881**, 172, 887.

[3] Norris K.H., Hart J.R., "Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds" *Proceedings of the 1963 Intl. Symp. on Humidity and Moisture, Washington D.C.*, **1965**, 4, 19-25.

[4] Norris K.H., Hart J.R., Golumbie C., "Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts", *Cereal Chemistry*, **1962**, 39, 94-99.

altamente reproducible (instrumentos de barrido, interferómetros, etc.) [5-6]. Igualmente, el desarrollo de equipos informáticos cada vez más potentes y a precios razonables fue una pieza clave para el progreso e implantación de la técnica.

Gracias a estos avances tecnológicos los espectroscopistas empezaron a mostrar interés por la técnica. En 1983 Wetzel la definía como "*Sleeper among Spectroscopic Techniques*" [7], indicando que la técnica tenía un gran potencial aunque hasta aquel momento no había sido utilizada como técnica de análisis habitual. En 1994 Fred McClure dijo de esta técnica "*The Giant is Running Strong*" refiriéndose al elevado número de aplicaciones en diversos campos en las que intervenía la espectroscopia NIR como técnica de análisis [8].

Los motivos que hacen esta técnica atractiva son diversos:

- Permite registrar el espectro de muestras sólidas, líquidas o gaseosas.
- El tratamiento previo de la muestra es prácticamente nulo.
- El registro de los espectros es rápido.
- Es una técnica no destructiva.
- Se pueden realizar el análisis de múltiples parámetros a partir de un mismo espectro.
- Una vez establecida la calibración, el análisis de rutina es rápido.
- Los análisis pueden ser realizados en la misma línea de producción.
- Es una técnica barata.

Poco a poco la técnica NIR se ha ido introduciendo como técnica de análisis en diferentes áreas, encontrándose actualmente numerosas aplicaciones en el sector de la petroquímica [9], en el análisis de alimentos [10], de productos

[5] Noble D., "Analyzing on the INTERNET: Finding analytical chemistry on the Internet is still a challenge, but new resources and search tools are coming on line", *Anal. Chem.*, **1995**, 67(7), 255A-259A.

[6] Henry C.M., "Near-IR gets the job done", *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 625A-628A.

[7] Wetzel D.L., "Near Infrared Analysis", *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 1165A-1176A.

[8] McClure W., "Near Infrared Spectroscopy. The giant is running strong", *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 43A-53A.

[9] Blanco M., Villarroya I. "NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool", *Trends in Anal. Chem.*, **2002**, 21(4), 240-250.

farmacéuticos [11], de fibras textiles [12] y muchas otras aplicaciones en ámbitos muy diversos [13]. Finalmente la espectroscopia NIR ha sido aceptada como un método analítico, implementándose, en algunos casos, bajo normativas de garantía de calidad [14].

Como el estado de desarrollo en el que se encuentra la tecnología NIR se ha producido fundamentalmente en los últimos 45 años podría esperarse que, hoy por hoy, fuese una técnica madura próxima a alcanzar una fase de estancamiento. Sin embargo, éste no es el caso. El desarrollo de nuevas herramientas quimiométricas, la miniaturización de los componentes instrumentales y la aplicación a nuevos campos hace que la espectroscopia NIR esté en plena fase de expansión [13] [15].

3.2 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

3.2.1 ORIGEN DE LA ABSORCIÓN

Según la teoría ondulatoria de Maxwell, la luz ordinaria, al igual que las demás formas de radiación electromagnética, se presenta como una onda o vibración electromagnética que viaja en línea recta a velocidad uniforme (3×10^8 ms⁻¹, en el vacío) siendo la dirección de vibración de la onda perpendicular a la dirección de su propagación, figura 3.1.

[10] Pedersen D.K., Martens H., Nielsen J.P., Engelsen S.B., "Near-Infrared Absorption and Scattering Separated by Extended Inverted Signal Correction (EISC): Analysis of Near-Infrared Transmittance Spectra of Single Wheat Seeds", *Appl. Spec.*, **2002**, 56(9) 1206-1214.

[11] Blanco M., Romero M.A., Alcalá M., "Strategies for constructing the calibration set for a near infrared spectroscopic quantitation method", *Talanta*, **2004**, 64, 597-602.

[12] Blanco M., Coello J., García-Fraga J.M., Iturriaga H., MasPOCH S., Pagès J., "Determination of finishing oils in acrylic fibres by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy", **1997**, *Analyst*, 122, 777-781.

[13] Davies A.M.C., Garrido A., "The Proceeding of NIR-2003", **2004**, Ed. NIRpublications.

[14] Jensen J.L. "Acceptance of NIR as an analytical method", *Process Control and Qual.*, **1997**, 9, 161-166.

[15] Davies T., "The history of near infrared spectroscopic analysis: past, present and future from sleeping technique to the morning star of spectroscopy", *Analisis*, **1998**, 26(4) 17-19.

Cuando la radiación interactúa con la materia pueden ocurrir distintos procesos: reflexión, scattering, absorción, fluorescencia/fosforescencia y reacciones fotoquímicas.

Tabla 3.1. Regiones del espectro electromagnético.

REGIÓN	LONGITUD DE ONDA	ORIGEN DE LA ABSORCIÓN
Rayos X	0.01-190 nm	Transiciones de electrones internos de un átomo
Ultravioleta	190-360 nm	Transiciones de electrones π deslocalizados
Visible	360-780 nm	Transiciones de electrones externos: medidas de color
NIR	780-2500 nm	Sobretonos y bandas de combinación de vibraciones moleculares fundamentales
IR	2500-40000 nm	Vibraciones moleculares fundamentales
FIR	4×10^4 - 10^6 nm	Rotaciones moleculares
Microondas	10^6 - 10^8 nm	Rotaciones moleculares
Ondas de Radio	10^8 - 10^{12} nm	Cambio en la orientación del espín

En función de las aplicaciones analíticas y del fenómeno físico que provoca la absorción de energía por parte de la materia es posible dividir el espectro electromagnético en diferentes zonas. La región infrarroja podemos a su vez subdividirla en tres zonas: infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (IR) e infrarrojo lejano (FIR). Según la definición de la IUPAC, la radiación NIR abarca la región del espectro electromagnético comprendida entre 780-2500 nm (12800 - 4000 cm^{-1}) [16]. Ver tabla 3.1

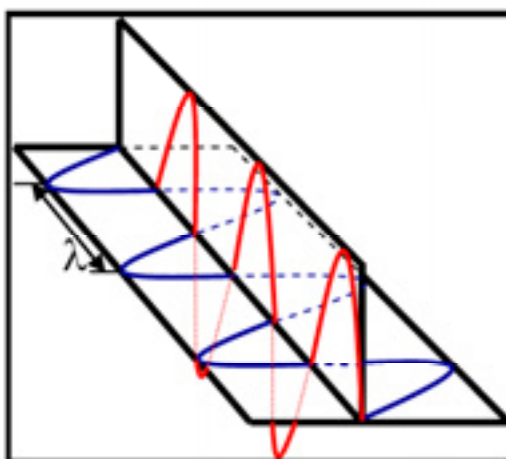


Figura 3.1. Esquema de propagación de una onda electromagnética. Oscilación de los vectores de los campos eléctrico y magnético.

[16] Sheppard N., Willis H.A., Rigg J.C., "Names, Symbols, Definitions and Units of Quantities in Optical Spectroscopy", Pure Appl. Chem., 1985, 57, 105-120.

La radiación infrarroja no es suficientemente energética como para producir las transiciones electrónicas que se dan cuando se trata de las radiaciones ultravioleta y visible. La absorción de radiación infrarroja se limita a especies moleculares con pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales [17].

Para que una molécula absorba radiación IR la energía de la radiación incidente debe corresponder a la diferencia de energía entre dos estados energéticos y debe producirse un cambio en el momento dipolar de la molécula debido a movimientos vibratorios o rotatorios. Si la frecuencia de la radiación iguala la frecuencia natural de vibración de la molécula se produce un cambio en la amplitud de la vibración de las moléculas y, por tanto, la absorción de la radiación [18].

Cuando se trata de especies homonucleares como O₂, N₂ o Cl₂, el momento dipolar no se altera durante la vibración o la rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

Los movimientos vibratorios que presenta una molécula pueden ser básicamente de dos tipos:

- De **estiramiento**, vibración en la que se produce un cambio en la distancia interatómica a lo largo del eje de enlace entre dos átomos.
- De **flexión**, en la que además se produce un cambio en el ángulo de enlace.

Estos dos tipos básicos presentan a su vez diferentes modos de vibración, ver figura 3.2.

[17] Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., "Principios de análisis instrumental", 2001, Ed. McGraw-Hill.

[18] Murray L., Williams P.C., "Chemical principles of near-infrared technology. In *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*", 1987, Ed. Am. Assoc. of Cereal Chemists, (St. Paul, Minnesota).

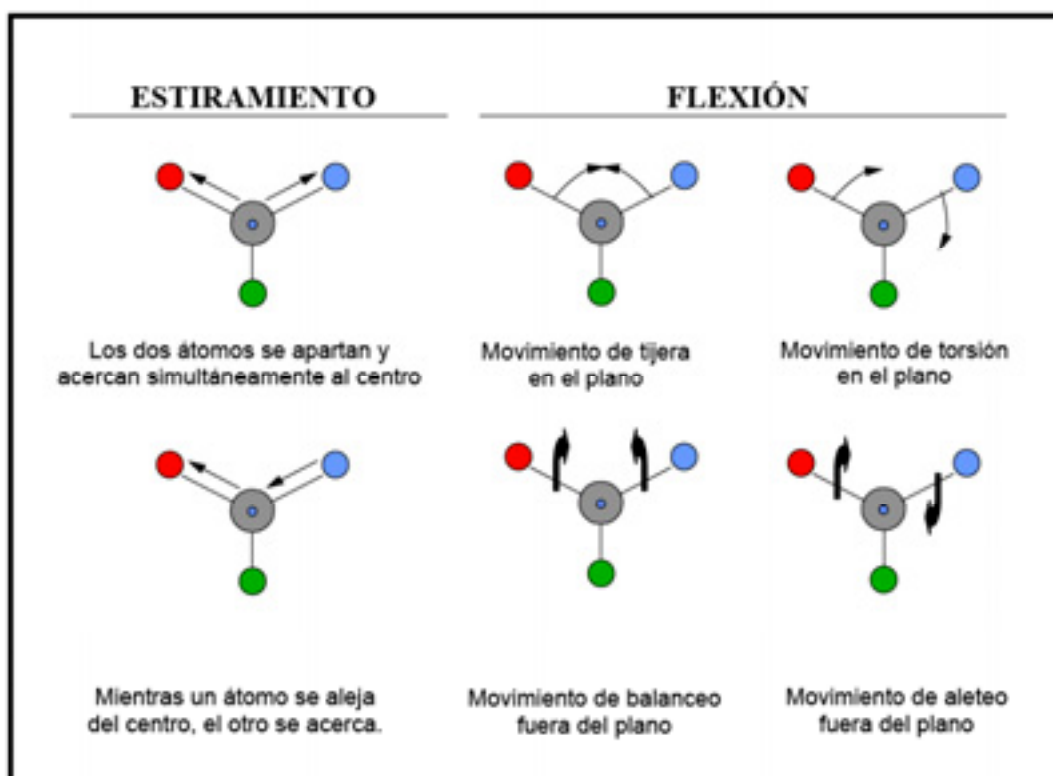


Figura 3.2. Vibraciones moleculares por estiramiento y por flexión entre dos átomos respecto a un átomo central.

3.2.2 OSCILADOR ARMÓNICO-ANARMÓNICO

Las características de vibración de una molécula diatómica pueden aproximarse a las de un oscilador armónico simple: dos masas unidas por un resorte, una de las cuales vibra a lo largo del eje de este resorte. La energía potencial E de esta vibración es 0 cuando la masa se acerca a su posición de equilibrio. Al comprimir o extender el resorte, la energía potencial del sistema aumenta, haciéndose máxima cuando la distancia entre las dos masas es máxima o mínima. Esta energía potencial puede definirse como:

$$E = \frac{1}{2} kx^2 \quad [3.1]$$

Donde k es la constante de fuerza, que depende del resorte, (del enlace en el caso de las moléculas) y x es el desplazamiento del objeto (de los átomos).

La curva de la energía potencial para una oscilación armónica simple es una parábola como en la figura 3.3.

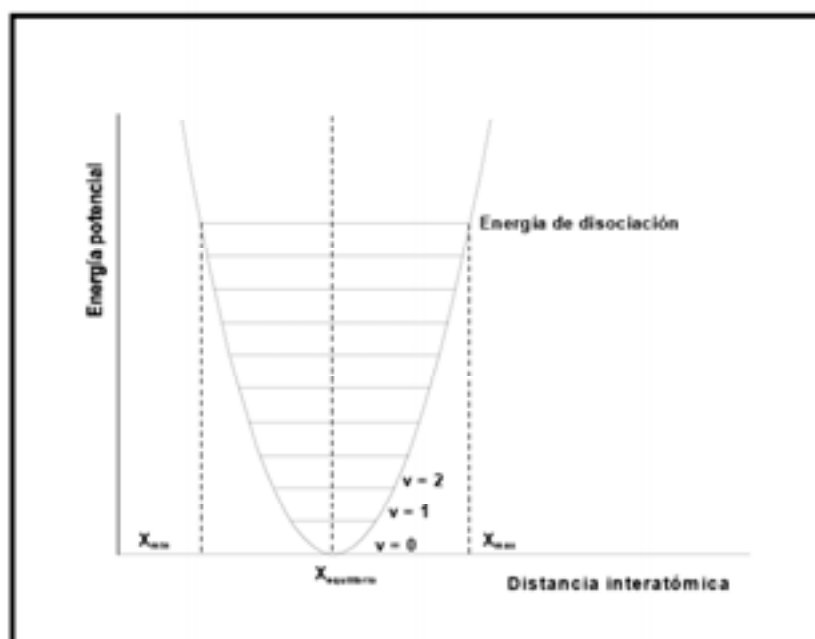


Figura 3.3. Energía potencial para el modelo del oscilador armónico. Mínima y máxima amplitud de vibración.

Para explicar el comportamiento de dos masas (m_1 , m_2) unidas por un muelle perfectamente elástico podemos utilizar la ley de Hooke [3.2] y la segunda ley de Newton [3.3]

$$F = -kx \quad [3.2]$$

$$F = m \frac{d^2 x}{dt^2} \quad [3.3]$$

Igualando las dos anteriores expresiones obtenemos como solución:

$$x = A \sin(\nu t); \quad \nu = \frac{\sqrt{k}}{2\pi} \sqrt{\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}} \quad [3.4]$$

Donde A es el desplazamiento máximo, ν es la frecuencia natural de vibración y m la masa efectiva. Sistemas formados por más de dos masas siguen un comportamiento similar aunque la expresión de las ecuaciones se complica. Usando este simple modelo es posible explicar un gran número de observaciones espectrales en el Infrarrojo medio [19].

[19] Osborne B.G., Fearn T., Hindle P.H., "Practical NIR Spectroscopy", 1993, Ed. Longman S&T.

Pero las ecuaciones de la mecánica clásica no describen completamente el comportamiento de partículas atómicas, ya que no recogen la naturaleza cuantizada de las energías vibracionales moleculares. Para cada molécula, existen niveles discretos de energía y las únicas transiciones posibles son entre niveles energéticos consecutivos. Resolviendo las ecuaciones cuánticas, para un sistema diatómico, la energía vibracional se puede expresar como:

$$E_{\text{vib}} = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) h \nu = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad [3.5]$$

Donde ν es el número cuántico vibracional (que sólo puede adquirir valores enteros: 0, 1, 2) y h es la constante de Planck.

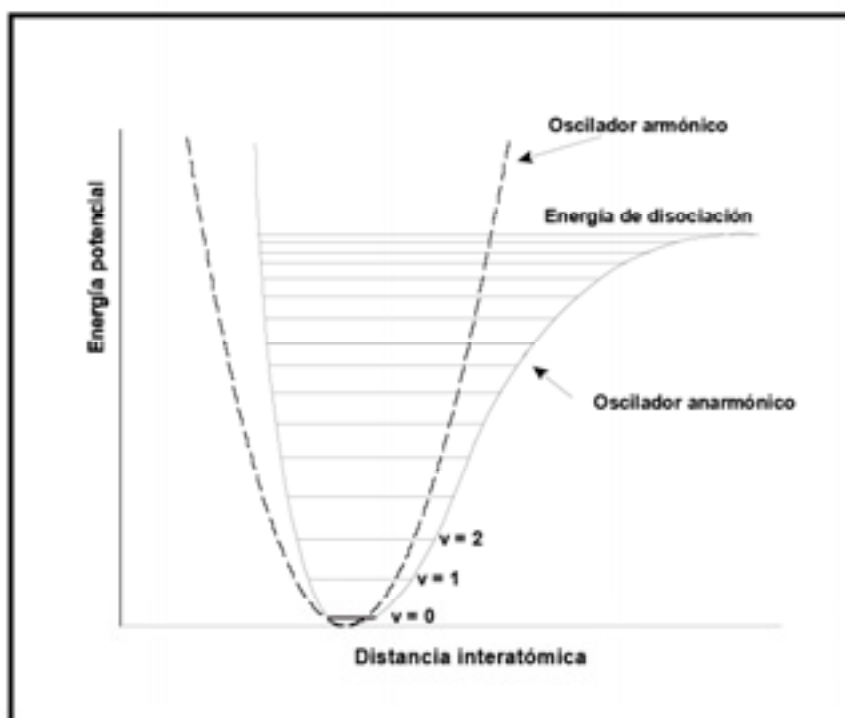


Figura 3.4. Energía potencial para el oscilador armónico y anarmónico. Diferente espaciado entre los niveles energéticos.

Pero el modelo del oscilador armónico, aún teniendo en cuenta consideraciones cuánticas, resulta incompleto para describir la vibración molecular. Cuando dos átomos se acercan experimentan una repulsión coulombica, entre los dos núcleos, que actúa en la misma dirección que la fuerza restauradora del enlace, por lo que la energía potencial se elevará más rápidamente que lo que

predice el modelo armónico. Por el contrario, cuando los átomos se alejan, se produce una disminución de la fuerza restauradora al acercarse la distancia interatómica a la distancia de disociación del enlace, por lo que la energía potencial disminuye. Así, podemos decir que las moléculas reales se acercan más al comportamiento de un oscilador anarmónico y que ambos modelos convergen entorno a la posición de equilibrio, ver figura 3.4.

Las ecuaciones de onda de la mecánica cuántica permiten obtener curvas de energía potencial más correctas para las vibraciones moleculares. Sin embargo, la elevada complejidad matemática implica que estas ecuaciones sólo permiten ser aplicadas cuantitativamente a sistemas muy sencillos. Una aproximación empírica que describe adecuadamente el comportamiento del oscilador anarmónico fue propuesta por Morse [20]

$$E = E_D \left(1 - e^{-\alpha x}\right)^2 \quad [3.6]$$

Donde α es una constante específica para cada molécula y E_D es la energía de disociación. Cuando la ecuación anterior es utilizada para resolver ecuaciones mecánicas de onda, la solución de la energía vibracional para el oscilador anarmónico se expresa como:

$$E_{\text{vib}} = \left(\nu + \frac{1}{2}\right) h\nu - \left(\nu + \frac{1}{2}\right)^2 h\nu y - \left(\nu + \frac{1}{2}\right)^3 h\nu y' - \dots \quad [3.7]$$

Donde y, y', \dots son denominadas constantes de anarmonicidad cuyos valores son positivos, pequeños y decrecientes en magnitud, por esta razón, para valores pequeños de ν , el tercer término y superiores pueden ser ignorados, quedando la anterior expresión como:

$$E_{\text{vib}} \approx \left(\nu + \frac{1}{2}\right) h\nu \left[1 - x \left(\nu + \frac{1}{2}\right)\right] \quad [3.8]$$

Si reemplazáramos ν por $\nu' = \nu \left[1 - x \left(\nu + \frac{1}{2}\right)\right]$ en la ecuación de energía asociada al oscilador armónico, [3.5], se transformará en la ecuación de energía [3.8]. De esta manera, el oscilador anarmónico se comporta como el armónico

[20] Chalmers J.M., Griffiths P.R., "Handbook of Vibrational Spectroscopy. Vol.1", 2002, Ed. Wiley.

pero con una frecuencia de oscilación que decrece progresivamente cuando ν aumenta.

Finalmente, la expresión de la energía asociada a una determinada transición, es decir, la diferencia entre dos estados energéticos, viene expresada por:

$$\Delta E = h\nu[1-(2\nu + \Delta\nu + 1)y] \quad [3.9]$$

Como consecuencia de la anarmonicidad, no sólo es posible observar la banda fundamental $\Delta\nu=\pm 1$, sino que también pueden ser observadas bandas correspondientes a transiciones $\Delta\nu=\pm 2, \pm 3, \dots$ las cuales son conocidas como sobretonos.

3.2.3 ABSORCIÓN DE LAS BANDAS EN EL INFRARROJO CERCANO

El origen de la absorción de las bandas en el infrarrojo cercano es el mismo que para las bandas en el infrarrojo medio: una molécula absorberá radiación NIR si la energía de la radiación se corresponde a la diferencia energética entre dos niveles vibracionales y se da un cambio en su momento dipolar. Sin embargo, en la zona NIR no aparecen bandas correspondientes a vibraciones fundamentales ($\Delta\nu=\pm 1$), como ocurre en la zona del infrarrojo medio [21]. En esta zona aparecen las bandas denominadas sobretonos, correspondientes a transiciones energéticas en las que $|\Delta\nu|>1$, aunque en la práctica, y dependiendo del tipo de enlace, sólo los sobretonos primero $\Delta\nu=\pm 2$, segundo $\Delta\nu=\pm 3$ y tercero $\Delta\nu=\pm 4$ presentan una probabilidad susceptible de ser observada. Los sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores que las predichas como múltiplos de las frecuencias fundamentales, debido al diferente espaciado entre los niveles energéticos en el modelo anarmónico.

Además de los sobretonos, en la región NIR también aparece otro tipo de bandas de absorción; en las moléculas poliatómicas pueden darse cambios simultáneos en la energía de dos o más modos de vibración. La interacción entre

[21] Hildrum K.I., Isaksson T., Naes T., Tandberg A., "Near Infra-red Spectroscopy", 1992, Ed. Ellis Horwood.

ellos da lugar a bandas de combinación cuyas frecuencias son combinaciones lineales de cada una de las frecuencias fundamentales que interaccionan:

$$\nu_{comb} = n_1\nu_1 \pm n_2\nu_2 \pm n_3\nu_3 \dots \quad [3.10]$$

Donde n_1, n_2, \dots son números enteros. Las bandas de combinación son de baja probabilidad y, por tanto baja intensidad, exceptuando las procedentes de dos modos de vibración que comparten un átomo en común y las que proceden de enlaces múltiples, igualmente, son más frecuentes aquellas en las que $n_i = 1$

Las transiciones no fundamentales son mucho menos probables que las correspondientes a transiciones entre niveles consecutivos, por lo que las bandas NIR son de intensidad menor que las que aparecen en la zona del IR medio, además de ser anchas y de no estar tan bien definidas, como resultado del solapamiento de sobretonos y bandas de combinación.

Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos ligeros y con diferente peso molecular que les confiere una gran anarmonicidad, como por ejemplo, C-H, N-H, O-H, S-H. En la figura 3.5 se muestran las regiones NIR donde absorben los diferentes enlaces. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F, C-Cl, en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto, los primeros sobretonos también aparecen en esta región.

Una característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno, afectan al espectro NIR, por lo que un espectro NIR también incorpora información sobre la estructura cristalina de la sustancia.

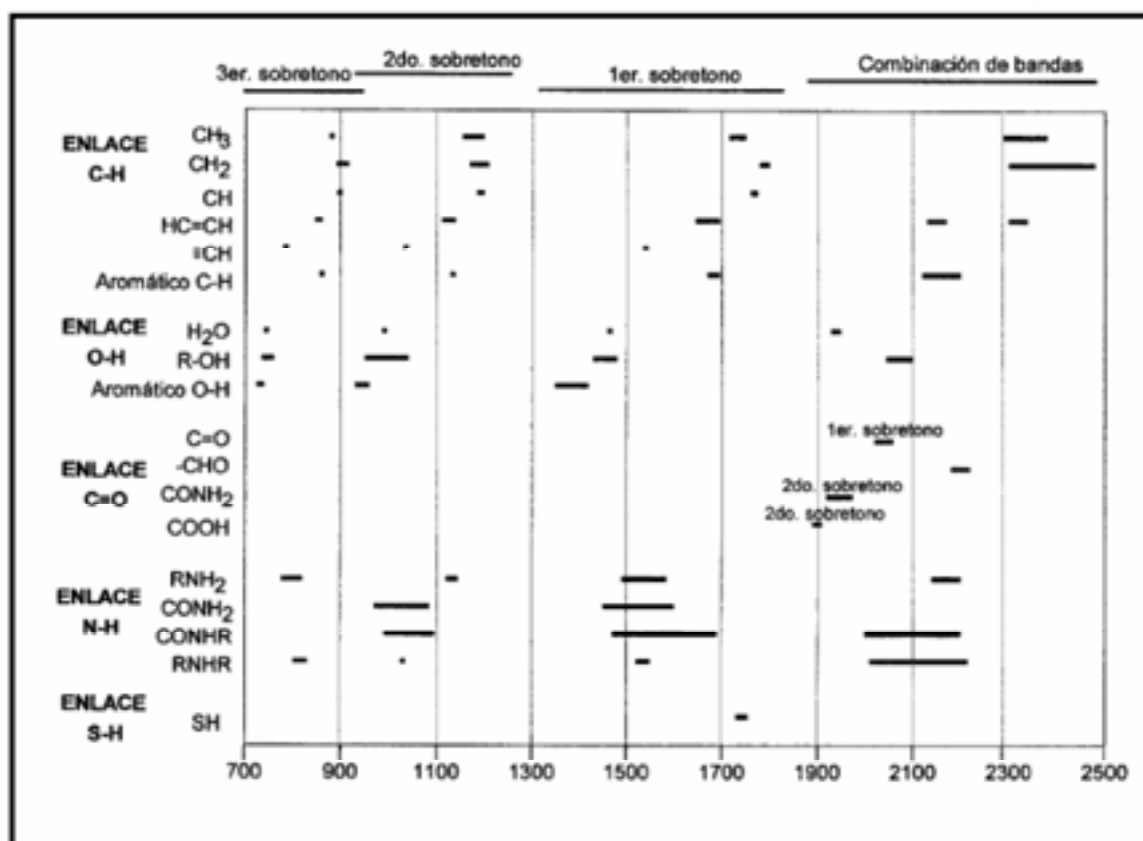


Figura 3.5. Representación gráfica de las zonas del espectro NIR donde se manifiestan los principales grupos funcionales.

3.2.4 INSTRUMENTACIÓN

Debido a la baja intensidad de las bandas NIR, el nivel de exigencia de los espectrofotómetros NIR, en términos de nivel de ruido permisible y estabilidad instrumental, debe ser mayor que en otros instrumentos, sobre todo si se pretende aplicar al análisis cuantitativo. Ésta es una de las causas de la tardía aparición de los primeros espectrofotómetros NIR, que empezaron a comercializarse sólo cuando los avances tecnológicos permitieron obtener niveles adecuados de sensibilidad, reproducibilidad y ruido. En la figura 3.6 se muestra como, a lo largo de los últimos 50 años, el desarrollo y mejora de diferentes herramientas y piezas de instrumentación fue "motor" para la aplicación y divulgación de diferentes aplicaciones NIR [22].

[22] <http://www.nir-spektroskopie.de>, 2005.

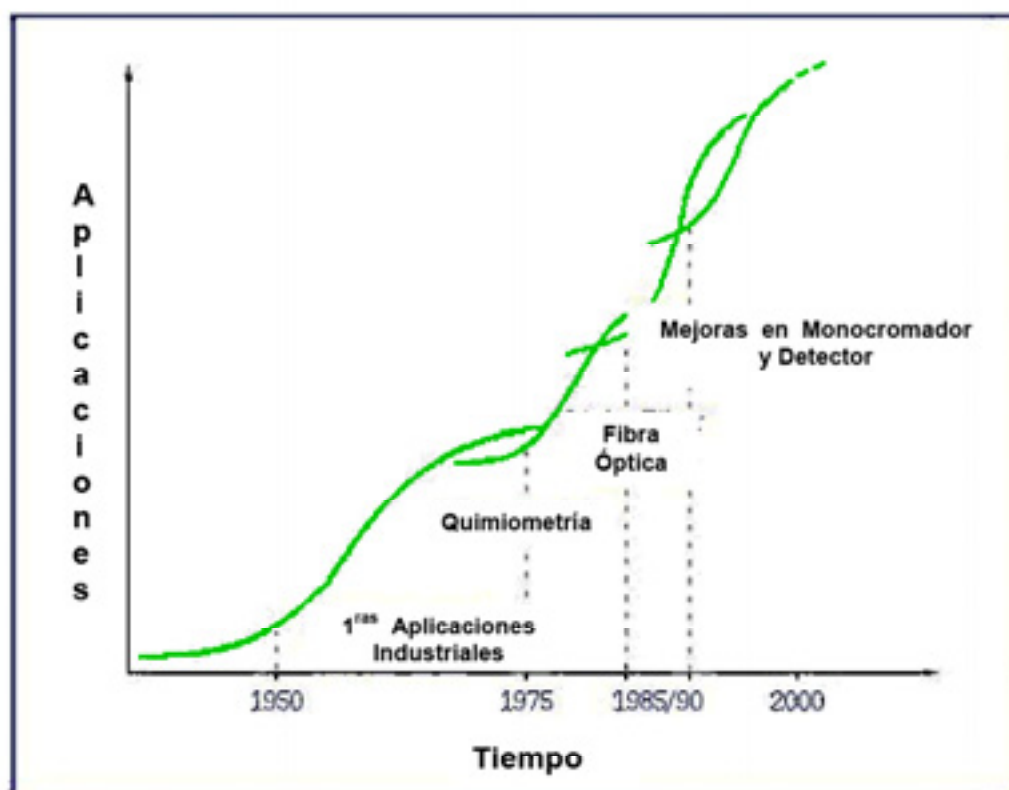


Figura 3.6. Esquema donde se recoge las mejoras tecnológicas que han impulsado la utilización y aplicación de la espectroscopia NIR.

El esquema básico de un instrumento NIR no difiere de cualquier espectrofotómetro. Sus componentes básicos son: fuente de radiación, sistema de selección de longitud de onda, compartimento de muestra y detector. A continuación se describen con más detalle las diferentes partes integrantes de un instrumento NIR.

3.2.4.1 Fuente de radiación

La fuente de radiación más utilizada es la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo, capaz de proporcionar un espectro continuo en la región de 320-2500nm. Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los denominados LEDs (*Light Emitting Diodes*) [23-24], que dependiendo de su

[23] Bonanno A.S., Griffiths P.R., "Discrimination of organic solvents using an infrared-emitting diode-based analyzer. Part I: Feasibility", *Appl. Spectrosc.*, **1995**, 49(11), 1590-1597.

[24] United States Patent. Patent Number 4.286.327, **1981**.

composición pueden llegar a emitir hasta los 1600 nm, pero no por encima de esa longitud. Los instrumentos que incorporan este último sistema de fuente de radiación no requieren un sistema de selección de longitudes de onda.

3.2.4.2 Sistemas de selección de longitudes de onda

Disponer de un sistema adecuado de selección de longitudes de onda es un factor importante para poder obtener un buen nivel de sensibilidad. Un buen sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de:

- Proporcionar un ancho de banda preciso y exacto para la longitud de onda analítica.
- Proporcionar señales altas a fin de conseguir una relación señal/ ruido satisfactoria.

En función del dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, los instrumentos NIR pueden ser clasificados en: instrumentos de filtros, monocromadores e instrumentos de transformada de Fourier.

Los **instrumentos de filtros** seleccionan las longitudes de onda interponiendo entre la fuente y la muestra materiales que permiten el paso de determinadas longitudes de onda [25]. Los más sencillos son los filtros de absorción que transmiten longitudes de onda de forma selectiva según sea el material del que estén hechos. Otro tipo son los filtros de interferencia óptica [26-27] (o de Fabry-Perot). Las longitudes de onda transmitidas dependen del índice de refracción del material y del grosor del filtro. Los filtros de interferencia transmiten mayor cantidad de radiación que los filtros de absorción con anchos de banda más estrechos.

Los **monocromadores** son dispositivos que descomponen la luz policromática que proviene de la fuente de radiación en longitudes de onda discretas. La radiación entra en forma de haz estrecho y un elemento dispersante, que puede ser un prisma o una red de difracción, la descompone. Los más

[25] Burns D.A., Ciurczak E.W., "Handbook of Near-Infrared Analysis", 2001, Ed. Marcel Dekker.

[26] United States Patent. Patent Number 3.861.788, 1973.

[27] United States Patent. Patent Number 4.082.464, 1976.

utilizados actualmente son los que incorporan una red de difracción, ya que son más baratos, proporcionan mejor separación de longitudes de onda y dispersan linealmente la radiación [28]. Un último tipo de monocromador es el llamado optoacústico (AOTF), que aprovecha la propiedad de ciertos materiales (como el TeO_2) para cambiar su índice de refracción cuando es atravesado por una onda sonora; convirtiéndose, así, en una red capaz de difractar ciertas longitudes de onda de un haz incidente [29].

Los instrumentos de **transformada de Fourier** dividen la luz en dos haces cuyas longitudes de trayectoria se pueden variar periódicamente para dar modelos de interferencia mediante un espejo móvil. Variando la posición de estos espejos se pueden crear interferencias constructivas o destructivas. Recombinando los dos haces se obtiene una señal; el interferograma. Mediante la transformada de Fourier se convierte el interferograma (representación de la señal en dominio tiempo) en el espectro (dominio de frecuencias).

3.2.4.3 Compartimento de muestra

Una de las grandes ventajas de la espectroscopia NIR es la versatilidad y adaptabilidad que presenta para analizar muestras de distinta naturaleza. Para las muestras en forma sólida, la medida efectuada es por reflectancia difusa. En cambio, muestras líquidas suelen medirse por transmisión de radiación. Un caso intermedio es el de muestras que se miden por transreflectancia, en el que parte de la luz incidente es reflejada en la muestra y otra parte la atraviesa, para ser reflejada por un dispositivo transreflectante, diseñado de tal forma, que también delimita el camino óptico. En la figura 3.7 se muestran los tres modos de interacción de la radiación NIR con la materia.

[28] Skoog D.A., "Principles of Instrumental Analysis", 1997, Ed. Brooks Cole.

[29] Sato H., Saito N., Akagawa K., Wada, S., Tashiro H., "Electronically tunable-laser light sources for near infrared spectroscopy", J. of Near Infrared Spectrosc., 2003, 11(4), 295-308.

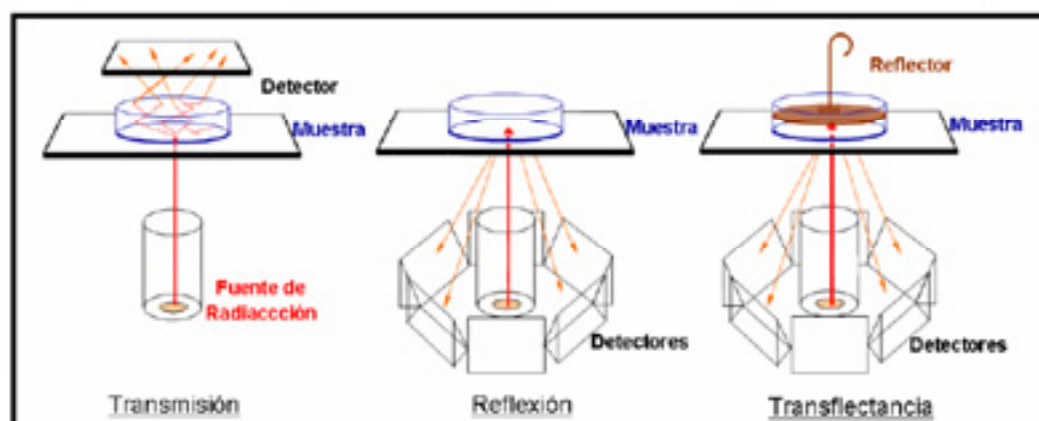


Figura 3.7. Diferentes modos de interacción de la materia con la radiación NIR.

3.2.4.4 Detector

Detectores habituales en espectroscopia en el infrarrojo próximo son los construidos con semiconductores (como InGaAs, PbS, InAs, InSb, Si,...). Hasta 1100 nm el semiconductor más utilizado en los detectores es el Si, y en la región entre 1100 y 2500 nm el material fotoconductor más utilizado es el PbS.

3.3 APLICACIONES NIR EN EL CONTROL DE PROCESOS

En 1987 Callis y colaboradores [30] acuñaron el termino PAC (*Process Analytical Chemistry*) para definir las aplicaciones analíticas cuyo objetivo es proporcionar información cualitativa y cuantitativa del proceso químico. Esta información puede ser usada no sólo para monitorizar y controlar el proceso, sino también para optimizar el uso de energía, tiempo y materias primas.

En este mismo trabajo se describen las diferentes etapas de la química analítica de procesos:

- *Off-line:* toma de muestra manual y llevada al laboratorio para su posterior análisis. Esta forma de proceder conduce a un retraso considerable entre los momentos de toma de muestra y de emisión del informe analítico final.

[30] Callis J.B., Illman D.L., Kowalski B.R. "Process Analytical Chemistry", *Anal. Chem.*, **1987**, 59 624A-637A.

- *At-line*: toma de muestra manual, pero instrumentación analítica cerca de la línea de proceso, con lo que el tiempo entre la toma de muestra y la realización del análisis es menor.
- *On-line*: toma de muestra automatizada y llevada al instrumento analítico. Una vez la muestra ha sido acondicionada y transportada hasta el instrumento, el análisis puede ser intermitente (métodos que requieren la inyección de una porción de la muestra, como la cromatografía de gases) o continuo (métodos que permiten el flujo continuo de muestra, como los métodos espectrofotométricos).
- *In-line*: análisis químico hecho in-situ dentro de la línea de proceso, introduciendo sondas químicamente sensibles al analito.

La evolución desde los métodos *off-line* a los *in-line* ha sido posible gracias al desarrollo de sondas de inmersión equipadas con haces de fibra óptica, encargadas de conducir la radiación desde la fuente a la muestra, fibras aferentes, y posteriormente, recoger la radiación refractada por la muestra y llevarla hasta el detector a través de fibras eferentes.

Actualmente, el diseño de las fibras ópticas permite el registro de espectro *in-line* mediante medidas de transmisión, reflectancia o transflectancia, figura 3.8. Las medidas de reflectancia pueden ser realizadas a través de una ventana en la línea de procesos. Las medidas de transmisión las podemos realizar insertando dos sondas de fibra óptica una enfrente de la otra, de manera que por una sonda llegue la luz y la otra recoja la radiación que no ha absorbido la muestra. Existe otro tipo de sondas, con las que se realizan medidas de transflectancia, en las que la radiación llega a través de la sonda de fibra óptica, atraviesa la muestra y después de reflejarse en un dispositivo reflectante, cuya posición delimita el camino óptico, la radiación llega al detector a través de la misma sonda [31].

[31] Hassell C., Bowman E.M, "Process Analytical Chemistry for Spectroscopist", Appl. Spectrosc., 1998, 52(1), 18A-28A.

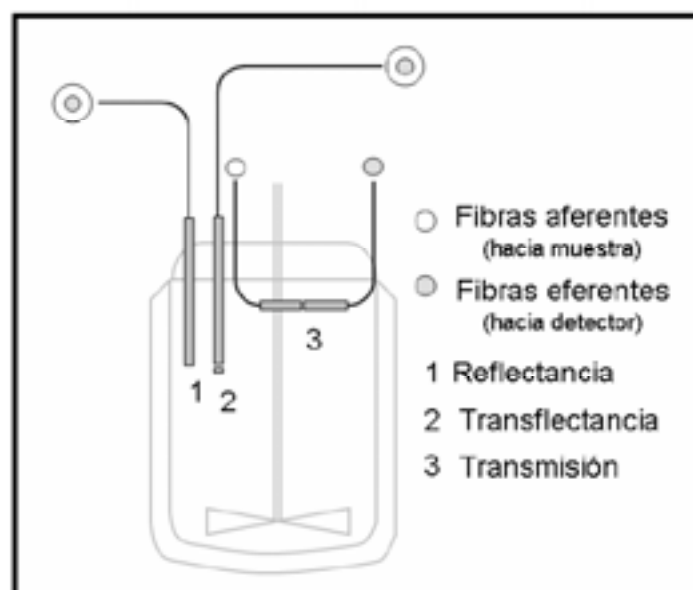


Figura 3.8. Registro de espectros en continuo (*in-line*) mediante diferentes tipos de sonda.

En la última década, el número de publicaciones científicas relacionadas con el uso conjunto de la espectroscopia NIR y el análisis multivariable aplicado a la monitorización *in-line* y el control de procesos ha crecido paulatinamente [13], [32], al igual que la aceptación de esta técnica como control rutinario en el mundo industrial, ya que, una vez establecida la calibración, el análisis de rutina es rápido. Efectivamente, el hecho de poder realizar los análisis *in-situ* mediante espectroscopia NIR proporciona una serie de ventajas que mejoran la producción [33-34]. Entre estas ventajas podemos destacar:

- Bajo mantenimiento del equipo.
- No se usan reactivos, no se generan residuos.
- Rápida realización de los análisis. Obtención de información analítica e forma inmediata.
- Posibilidad de calibración para diversos analitos (multicomponentes).

[32] Van Staden J.F. "Analytical aspects of chemical process control. Part 1. Fundamentals", *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71(12), 2303-2308.

[33] Moessner R.C., "Utility of near-infrared analyzers for real-time process control", *Proc. Contr. and Qual.*, **1992**, 2, 237-246.

[34] Dotzlaw G, Weiss M.D. "Improve on-line process control with near-infrared analysis", *Chem. Eng. Progress*, **1993**, 9, 42-45.

- Posibilidad de retroalimentación y actuación sobre el proceso al momento a través de algoritmos de control.
- La obtención rápida de los resultados permite controlar el proceso y evitar los productos fuera de especificaciones.
- Análisis no destructivo.

Las aplicaciones de la espectroscopia NIR en el control de procesos [35] abarcan campos tan diferentes y diversos como: el agrario, el alimentario, industria farmacéutica, industria química, petroquímicas, ciencias de la tierra, monitorización ambiental, química clínica y médica y biotecnología.

3.3.1 APLICACIONES NIR EN EL CONTROL DE BIOPROCESOS

Para optimizar la producción y síntesis de productos procedentes de bioprocesos, es necesario controlar y tener información del estado del proceso en tiempo real. La falta de este tipo de información debido al tiempo necesario para realizar las diferentes etapas de la determinación química tradicional: muestreo, análisis y cálculo para proporcionar un resultado, provoca que actualmente, la mayoría de bioprocesos se desarrollen bajo condiciones subóptimas. [36-37]

La utilización de la espectroscopia NIR en el análisis y monitorización de bioprocesos no sólo soluciona los problemas citados anteriormente, proporcionando información útil para la toma de decisiones, sino que además, es un elemento fundamental tanto en la investigación, como en la optimización de los factores que condicionan el proceso, convirtiéndose en una útil herramienta tanto a nivel de producción como de investigación [38].

[35] Workman J. Jr.; Veeltkamp D.J., Doherty S., Anderson B.B., Creasy K.E., Koch J., Tatera F., Robinson L., Bond L., Burgess W., Bokerman, G.N., Ullman H.A., Darsey G.P., Mozayeni F., Bamberger J.A., Greenwood M.S., "Process Analytical Chemistry", *Anal. Chem.*, **1999**, 71(12), 121R-180R.

[36] Arnold S.A., Harvey L.M., McNeil B., Hall J.W., J. "Employing near-infrared spectroscopic methods of analysis for fermentation monitoring and control: Part 1, method development" *BioPharma Intl.*, **2002**, 15(11), 26-34.

[37] Arnold S.A., Harvey L.M., McNeil B., Hall J.W., J. "Employing near-infrared spectroscopic methods of analysis for fermentation monitoring and control: Part 2, implementation strategies" *BioPharma Intl.*, **2003**, 16(1), 47-70.

[38] Brimmer P.J., DeThomas F.A., and Hall J.W., "Near infrared Technology in the Agricultural and Food Industries", **2001**, Ed. American Association of Cereal Chemist.

Las aplicaciones más destacadas de la espectroscopia NIR en el seguimiento de diferentes bioprocesos se encuentran citadas, en función del microorganismo utilizado, en la tabla 3.2.

- [39] Cavinato A.G., Mayes D.M., Ge Z., Callis J.B., "Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near-infrared spectroscopy", *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 1977-1982.
- [40] Ge Z., Cavinato A.G., Callis J.B., "Noninvasive Spectroscopy for Monitoring Cell Density in a Fermentation Process", *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1354-1362.
- [41] Cimander C., Bachinger T., Mandelius C.F., "Integration of distributed multi-analyzer and control in bioprocessing based on a real-time expert system", *J. Biotech.*, **2003**, 103(3), 237-248.
- [42] Vaccari G., Dosi E., Campi A.L., Gonzalez-Vara A., Matteuzzi D., Mantovani G., "A near-infrared spectroscopy technique for the control of fermentation processes: an application to lactic acid fermentation", *Biotech. Bioeng.*, **1993**, 43, 913-917.
- [43] Hall J.W., McNeil B., Rollins M.J., Draper I., Thompson B.G., Macaloney G. "Near-infrared spectroscopic determination of acetate, ammonium biomass and glycerol in an industrial *Escherichia coli* fermentation", *Appl. Spectrosc.*, **1996**, 50, 102-108.
- [44] Cimander C., Mandenius C.F., "Bioprocess control from a multivariate process trajectory", *Bioprocess and Biosyst. Engineering*, **2004**, 26(6), 401-411.
- [45] Crowley J., Arnold S.A., Wood N., Linda M. H., McNeil B., "Monitoring a high cell density recombinant *Pichia pastoris* fed-batch bioprocess using transmission and reflectance near infrared spectroscopy" *Enzyme Microbial Tech.*, **2005**, 36, 621-628.
- [46] Sivakesava S., Irudayara J., Ali D., "Simultaneous determination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR and Ft-Raman spectroscopic techniques", *Process Biochemistry*, **2001**, 37(4), 371-378.
- [47] Riley M.R., Rhiel M., Zhou X., Arnold M.A., Murhammer D.W., "Simultaneous measurement of glucose and glutamine in insect cell culture media by near infrared spectroscopy", *Biotech. Bioeng.*, **1997**, 55, 11-15.
- [48] Yeung K., Hoare M., Thornhill N.F., Williams T., Vaghjiani J.D. "Near-infrared spectroscopy for bioprocess monitoring and control", *Biotech. Bioengineer*, **1999**, 63(6), 684-693.
- [49] Hagman A.; Sivertsson P. "The use of NIR spectroscopy in monitoring and controlling bioprocesses", *Process Control and Quality*, **1998**, 11(2), 125-128.
- [50] Crowley J., Woods N., Harvey L. McNeil B., "In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation", *Biotech. Bioengineer.*, **2003**, 84(1), 13-19.
- [51] Riley M.R., Crider H. M., Nite M.E., Garcia R.A., Woo J., Wegge R.M., "Simultaneous Measurement of 19 Components in Serum-Containing Animal Cell Culture Media by Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy" *Biotechnol. Prog.*, **2001**, 17(2), 376-378.
- [52] Vaidyanathan S., Macaloney G., Harvey L.M., McNeil B., "Assessment of the structure and predictive ability of models developed for monitoring key analytes in a submerged fungal bioprocess using near-infrared spectroscopy", *Appl. Spectrosc.*, **2001**, 55(4), 444-453.
- [53] Vaidyanathan S., Harvey L.M., McNeil B., "Deconvolution of near-infrared spectral information for monitoring mycelial biomass and other key analytes in a submerged fungal bioprocess", *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 428(1), 41-59.
- [54] Arnold S.A., Matheson L., Linda M. H., McNeil B., "Temporally segmented modelling: a route to improved bioprocess monitoring using near infrared spectroscopy?", *Bioitech. Lett.*, **2001**, 23(2), 143-147.
- [55] Vaidyanathan S., Allison A., Lilliana M., Pankaj M., Graeme M., McNeil B., Harvey L.M., "Critical Evaluation of Models Developed for Monitoring an Industrial Submerged Bioprocess for Antibiotic Production Using Near-Infrared Spectroscopy" *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16(6), 1098-1105.
- [56] Lopes J. A.; Costa P. F.; Alves T. P.; Menezes J. C. "Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications". *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2004**, 74(2), 269-275.
- [57] Arnold S.A., Crowley J., Vaidyanathan S., Matheson L., Mohan P., Hall J.W., Harvey L.M., McNeil B., "At-line monitoring of a submerged filamentous bacterial cultivation using near-infrared spectroscopy", *Enzyme Microbial Tech.*, **2002**, 27(9), 691-697.
- [58] Jung B., Lee S., Yang I.H., Good T., Coté G. L., "Automated on-line noninvasive optical glucose monitoring in a cell culture system", *Appl. Spectrosc.*, **2002**, 56(1), 51-57.

Espectroscopia NIR

ANALITO	DETALLES	Ref.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Etanol	Seguimiento on-line en fermentación alcohólica (batch). Cuantificación con PLS.	[39]
Biomasa	Seguimiento on-line en fermentación alcohólica (batch). Cuantificación con PLS.	[40]
Varios Analitos	Seguimiento on line a través de un sistema experto. Utilización de PLS, PCR, Redes Neuronales y MSPC.	[41]
<i>Escherichia coli</i>		
Acido Láctico	Seguimiento on-line. Cuantificación con MLR	[42]
Amoniaco. Glicerol. Acetato. Biomasa.	Seguimiento at-line en cultivo fed-batch. Cuantificación MLR y PLS.	[43]
Biomasa. Triptófano	Seguimiento on-line en continuo. Monitorización con MSPC.	[44]
<i>Pichia pastoris</i>		
Biomasa, Glicerol, Metanol	Seguimiento at-line en procesos en lotes alimentados (<i>fed- batch</i>). Cuantificación con MLR y PLS.	[45]
Cultivo Celular		
Glucosa	Seguimiento de glucosa on-line.	[46]
Glucosa, Glutamato	Seguimiento at-line en cultivo batch. Cuantificación con PLS.	[47]
Desechos celulares. proteínas, RNA	Seguimiento de contaminantes en un bioproceso para la obtención de Alcohol deshidrogenasa. Cuantificación PLS.	[48]
Proteínas	Determinación cualitativa y cuantitativa de la producción de proteínas. Seguimiento at line.	[49]
Glucosa, Glutamina Lactato, Amonio	Seguimiento on-line en cultivo batch. Cuantificación con PLS.	[50]
Diferentes Compuestos	Seguimiento at-line en cultivo batch. Cuantificación con PLS.	[51]
<i>Penicillium chrysogenum</i>		
Biomasa, Amonio, Azucares totales.	Seguimiento at-line. En cultivo batch. Cuantificación con MLR y PLS.	[52]
Biomasa. Penicilina	Seguimiento at-line en cultivo batch. Cuantificación con PLS.	[53]
<i>Streptomyces fradiae</i>		
Tilosina	Seguimiento at-line en cultivo batch. Cuantificación con PLS para cada fase del crecimiento.	[54]
Antibiótico	Seguimiento at-line en cultivo batch en escala producción . Cuantificación con PLS.	[55]
API (<i>Active pharmaceutical Ingredient</i>).	Seguimiento at-line en diferentes etapas del proceso de producción (Inóculo, Fermentación, Purificación). Cuantificación con PLS y Redes Neuronales.	[56]
Glutamato. Glucosa. Amonio.	Seguimiento at-line en cultivo batch de bacteria filamentosas. Cuantificación con PLS.	[57]
<i>Lactobacillus casei</i>		
Glucosa, Ácido Láctico, Biomasa	Seguimiento at-line en cultivo batch. Cuantificación PCR y PLS.	[58]

Tabla 3.2. Aplicaciones NIR más relevantes en el control de bioprocesos.