



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**

Grado en Ingeniería Química

**Valorización biotecnológica de subproductos/residuos
industriales: producción de ácido succínico y ácido láctico**

Autor: Ramos Andrés, Marta

**Tutor:
González-Benito, Gerardo**

**Cotutor:
García-Cubero, María Teresa**

Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, Julio de 2015



Resumen

Se ha estudiado el proceso biotecnológico de obtención de ácidos orgánicos (ácido succínico y ácido láctico) por *Actinobacillus succinogenes*.

Ambos ácidos tienen aplicaciones en alimentación, farmacia e industria química y de polímeros. Su obtención mediante un bioproceso presenta múltiples ventajas como la reducción de las necesidades energéticas y de emisiones de gases de efecto invernadero, así como el aprovechamiento de subproductos/residuos industriales.

Se han estudiado diferentes sustratos, así como la influencia de las variables de operación. La fermentación en condiciones anaerobias con flujo de dióxido de carbono ha dado lugar a la obtención mayoritaria de ácido succínico, con una producción de hasta 28,8 g/L, una productividad de 0,134 g/Lh y un rendimiento de 0,721 g/g. La fermentación con doble período aerobio-anaerobio ha dado lugar a la obtención mayoritaria de ácido láctico, con una producción de hasta 26,2 g/L, una productividad de 0,174 g/Lh y un rendimiento de 1,326 g/g.

Palabras clave: ácido succínico, ácido láctico, *Actinobacillus succinogenes*, sustrato, producto

Abstract

We have studied the biotechnological process of obtaining organic acids (succinic acid and lactic acid) by *Actinobacillus succinogenes*.

Both acids have applications in food, pharmacy, chemical industry and polymer industry. The obtaining by a bioprocess has many advantages like the reduction of the energy requirements and greenhouse gas emissions, as well as the use of industrial by-products/residues.

We have studied different substrates and the influence of operating variables. The fermentation in anaerobic conditions with flow of carbon dioxide results in the majority obtaining of succinic acid, with a production up to 28,8 g/L, a productivity of 0,134 g/Lh and a yield of 0,721 g/g. The fermentation with aerobic-anaerobic dual phase results in the majority obtaining of lactic acid, with a production up to 26,2 g/L, a productivity of 0,174 g/Lh and a yield of 1,326 g/g.

Keywords: succinic acid, lactic acid, *Actinobacillus succinogenes*, substrate, product





1.2. Mantenimiento.....	44
1.3. Medio y condiciones de cultivo.....	46
2. Experimentos en penicilin flasks.....	49
3. Experimentos en biorreactor.....	51
4. Métodos analíticos.....	53
4.1. Determinación del sustrato, producto y subproductos.....	53
4.2. Medida de biomasa.....	54
4.3. Observación microscópica de cultivos.....	55
Análisis de resultados.....	57
1. Ensayos en penicilin flasks.....	59
1.1. Ensayos con glucosa.....	59
1.2. Ensayos con lactosa.....	65
1.3. Ensayos con mezcla de glucosa y lactosa (co-fermentación).....	71
1.4. Ensayos con glicerol.....	74
1.5. Ensayos con manitol.....	75
1.6. Ensayos con suero lácteo.....	77
1.7. Comparación de distintos sustratos.....	83
2. Ensayos en biorreactor.....	89
2.1. Ensayos con lactosa.....	89
Conclusiones.....	99
Referencias.....	105
Anexos.....	111
Anexo I. Ensayos	
Anexo II. Cálculo de parámetros de fermentación	

Introducción

1. ÁCIDO SUCCÍNICO

1.1. Características y usos

El ácido succínico ($C_4H_6O_4$), o ácido butanodioico, es una importante molécula que puede ser transformada en una amplia gama de productos químicos y polímeros. Su obtención puede tener base petroquímica o biológica.

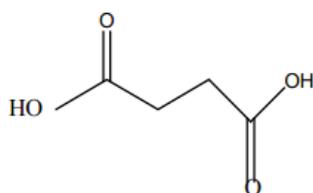


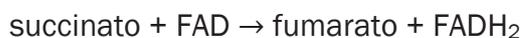
Figura 1. Fórmula molecular del ácido succínico.

Se presenta en forma de polvo blanco, inodoro y soluble en agua. Las propiedades físicas aparecen en la Tabla 1:

Número CAS	110-15-6
Estado físico	Polvo
Color	Blanco
Olor	Sin olor
pH	2,4-2,8 (1% en el agua)
Punto de fusión	185-187°C
Punto de ebullición	235°C
Presión de vapor	0,000025 Pa (25°C)
Densidad relativa	1,57 (20°C)
Solubilidad en el agua	83 g/L (25°C)
Pureza ácido comercial	98-100%

Tabla 1. Propiedades físicas del ácido succínico. (1)

Es un intermediario en el ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs. En su forma de anión succinato, interviene reduciendo la coenzima FAD, según la reacción siguiente:



Permite así la obtención de energía por fosforilación oxidativa tras la cesión de electrones a los intermediarios de la cadena de transporte de electrones.

El ácido succínico se encuentra en la naturaleza formando parte de diversas frutas, como las uvas y el albaricoque verde. Puede estar presente en la fermentación del vino, pero sobre todo en los músculos, en hongos, en el ámbar y en otras resinas (de donde se extrae por destilación). La cantidad de ácido succínico que se puede obtener de cualquier fuente natural es demasiado pequeña para tener valor comercial, por lo que en la industria química se prepara sintéticamente a partir del acetileno y del formaldehído. Se obtiene también por hidrogenación de los ácidos maleico y fumárico. (2,3)

Como ácido dicarboxílico que es, presenta una variedad de aplicaciones típicas de estos compuestos: plastificantes para polímeros, disolventes y lubricantes biodegradables, plásticos, agentes de curado epoxy, adhesivos y polvos de recubrimiento, inhibidores de la corrosión, electrolitos, perfumería, farmacia, etc. (4)

En cuanto al ácido succínico en concreto, tanto él como sus derivados tienen aplicación en los siguientes campos (5):

- Alimentación. Como aditivo alimentario (E-363). También como ingrediente para la estimulación animal y crecimiento de plantaciones.
- Farmacia
- Fabricación de plásticos biodegradables y polímeros
- Intermediario en la síntesis de tensoactivos, detergentes, disolventes ecológicos, cosméticos, cristales líquidos, etc.

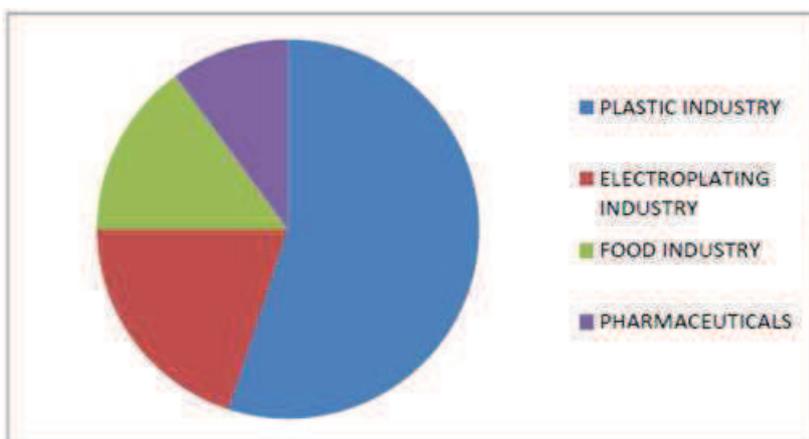


Figura 2. Mercados principales del ácido succínico (6).

Las principales reacciones y los principales derivados del ácido succínico son los siguientes:

- Reducciones de ácido succínico a 1,4-butanodiol, γ -butirolactona, tetrahidrofurano y sus derivados (7).

El 1,4-butanodiol (DBO), es un compuesto que se emplea como disolvente. Además presenta aplicaciones como intermediario en la fabricación de diversos plásticos, fibras elásticas, films y adhesivos, interviniendo también en la fabricación de diversos polímeros (polibutilensuccinato PBS, polibutilentereftalato PBT y tetrahidrofurano THF). Fundamentalmente es producido por vía petroquímica, pero la biológica es una alternativa deseable (8,9)

La γ -butirolactona se puede obtener por deshidrogenación endotérmica del DBO en fase gas y en presencia de catalizador. Es empleada como disolvente industrial y en la remoción de pinturas, lacas y adhesivos. También es un posible precursor de compuestos y un intermediario en la manufactura de derivados de la pirrolidona. Su hidrólisis da lugar al γ -hidroxibutírico (GHB), que se emplea como anestésico, y es considerado como droga ilegal en numerosos países (7,9).

El tetrahidrofurano (THF) se obtiene por ciclación del DBO. Tradicionalmente se fabrica a partir de compuestos fósiles. Su principal uso es como disolvente y como intermediario en la producción de poliuretanos termoplásticos, fibras elásticas, elastómeros moldeados, y copoliésteres o copoliamidas (7).

- Aminación reductiva de ácido succínico o de γ -butirolactona a pirrolidonas (7).

La 2-pirrolidona es un disolvente ampliamente utilizado en la fabricación y decapado de pinturas, industria petroquímica y como limpiador en microelectrónica. Es un intermediario de reacción de la industria química, de la industria de polímeros (polivinilpirrolidona, polipirrolidona) y de la farmacéutica, donde también se usa como vehículo de algunos fármacos de aplicación tópica (10).

- Polimerización de ácido succínico con dioles, usándose así como componente de partida para la obtención de poliésteres, como el polibutileno succinato (PBS) (7).



- Polimerización del ácido succínico con diaminas para formar poliamidas (7).
- Ésteres de succinato, por ejemplo el dietilsuccinato, que es usado como aditivo en el combustible o como disolvente respetuoso con el medio ambiente (7).
- Sales de succínico, formadas a partir del succinato obtenido en la fermentación. Se emplean como refrigerantes, podrían ser una alternativa a los glicoles. También destacan como compuestos para el deshielo con propiedades medioambientales más favorables que los convencionales (7).
- Succinimidas, que se utilizan como fármacos anticonvulsivos, incluyendo etosuximida, fensuximida y methsuximida. También se emplean para formar enlaces covalentes entre proteínas o péptidos y plásticos (7,11).

El mercado potencial del ácido succínico se puede dividir en tres principales usos (7):

- En la manufactura del butanodiol, tetrahidrofurano y butirolactona.
- Como nuevo intermediario en la síntesis de polímeros
- Como una sustancia análoga al anhídrido maleico.

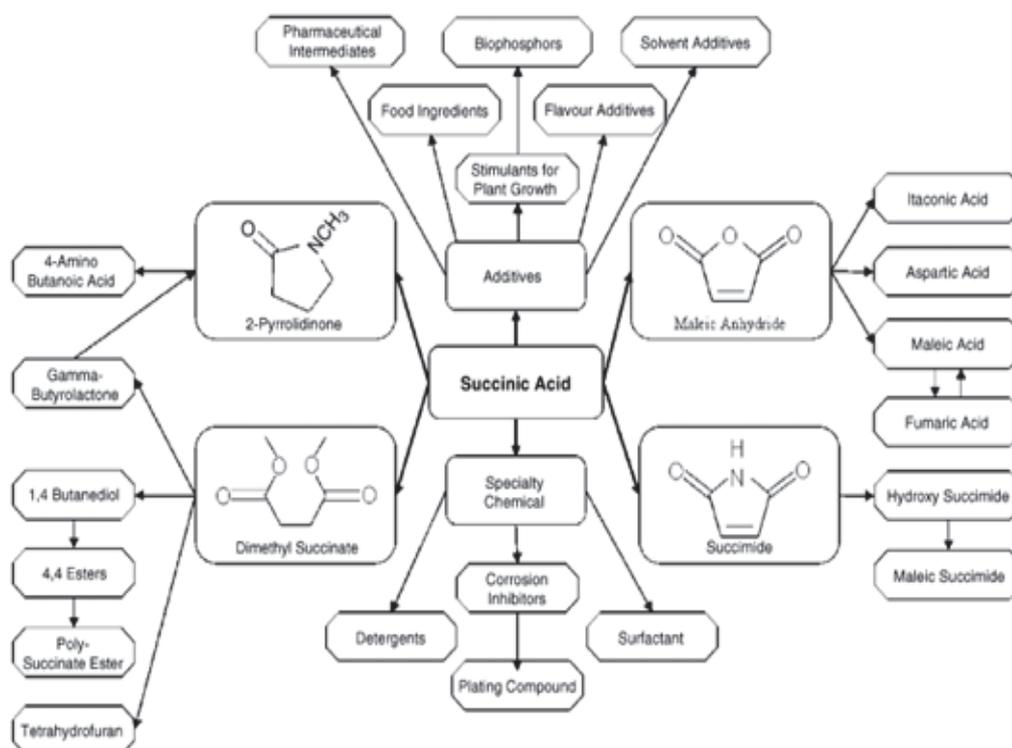


Figura 3. Aplicaciones del ácido succínico y productos químicos que pueden ser sintetizados a partir de él (12).

1.2. Obtención

Actualmente, la mayoría del ácido succínico comercial es producido a través de procesos petroquímicos, los cuales provocan contaminación medioambiental y preocupaciones relativas a desarrollo sostenible. La producción de ácido succínico a partir de fermentación microbiana es un proceso simple y respetuoso con el medio ambiente, sin embargo, hasta la fecha, el ácido succínico de base biológica no es competitivo con el ácido de base petroquímica debido principalmente a los altos costes de producción. Hay por tanto una necesidad de desarrollo de una tecnología que permita una producción económicamente efectiva de ácido succínico a partir de recursos renovables, como residuos de la industria (5).

La ruta de obtención convencional (petroquímica) más directa de ácido succínico (a partir de anhídrido maleico) es costosa, y en consecuencia el ácido succínico ha sido un producto de interés concreto y limitado, nunca un intermediario competitivo de la química orgánica industrial (9).

Los diversos avances acaecidos en cuando a la bioproducción de ácido succínico demuestran un interés creciente de la industria química por la obtención de este ácido vía biotecnológica, cuya causa es fundamentalmente económica.

1.2.1. Obtención química de ácido succínico

Aunque hay varios métodos tradicionales para la obtención de ácido succínico de base no biológica, el mayoritario es la ruta petroquímica basada en la hidrogenación de anhídrido maleico. Algunos de los principales, son los siguientes:

- Separación de ácido succínico de una mezcla de diferentes ácidos.

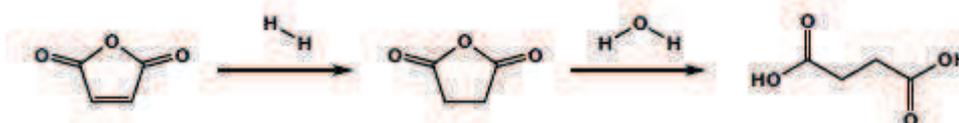
El ácido succínico puede ser producido como subproducto, formando parte de una mezcla de ácidos carboxílicos. La oxidación de la mezcla ciclohexanol/ciclohexanona con ácido nítrico produce ácido adípico como producto y una mezcla de ácido succínico y ácido glutárico como subproducto.

Otro ejemplo es la oxidación de hidrocarburos parafínicos con oxígeno, que produce ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, entre los que se encuentran el ácido levulínico, ácido succínico, ácido glutárico y ácido adípico, además de otros compuestos orgánicos de alto punto de ebullición.

El proceso de recuperación se compone de tres pasos: calentamiento de la mezcla pasando así el ácido succínico a anhídrido succínico; separación por destilación; y recuperación mediante cristalización o precipitación, seguido de filtración o centrifugación (13).

También se han llevado a cabo extracciones reactivas del ácido succínico de una mezcla con otros ácidos carboxílicos, empleando como agente extractor una amina terciaria (6).

- Hidrogenación de anhídrido maleico seguido de hidratación:



Anhídrido maleico → Anhídrido succínico → Ácido succínico

Figura 4. Ruta petroquímica de obtención de ácido succínico

El proceso se lleva a cabo con una corriente que es una solución de anhídrido maleico (contiene xileno, pentano, hexano, etc. como disolventes) y otra corriente que formada por hidrógeno. Ambas corrientes entran a un primer reactor de hidrogenación que opera a una temperatura entre 60-200°C y a una presión entre 1-10 MPa. El reactor consta de un lecho de catalizador de níquel, que utiliza como soporte $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$. El gas que no ha reaccionado se mezcla con una corriente fresca de hidrógeno y es recirculado al reactor, mientras que la corriente líquida pasa por un intercambiador de calor donde se enfría, y va hacia una segunda etapa de hidrogenación en un reactor catalítico. Éste reactor opera a temperatura entre 35-180°C y una presión entre 0,5-10 MPa. El gas y el líquido se separan de nuevo, obteniendo entonces anhídrido succínico, que si se somete a hidratación da lugar a ácido succínico. Se controlan las condiciones de reacción evitando así deposición o coquización causada por la polimerización de reactivo (14).

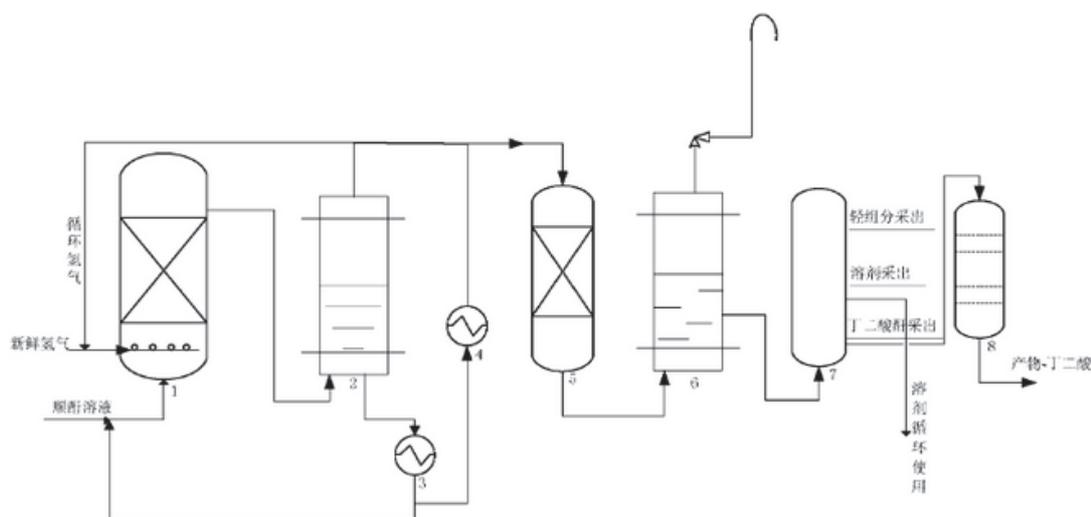


Figura 5. Diagrama de flujo de la producción petroquímica de ácido succínico (14).

- Síntesis electroquímica a partir de anhídrido maleico en una membrana dipolar: (6)

La electrorreducción del ácido málico es irreversible, y el proceso está controlado por la difusión de los electrones.



La reducción se lleva a cabo en acero inoxidable, empleando cobre y plomo como cátodos, entre los cuales se sitúa una membrana de intercambio iónico altamente conductora.

Presenta como ventajas un elevado rendimiento, reducido coste, alta pureza y muy baja formación de residuos. Por ello, el ácido succínico producido por este método puede ser empleado en alimentación y farmacia.

- Producción a partir de acetileno, monóxido de carbono y agua: (6)

Se emplea como catalizador $[K_2Ni(CN)_4]$. Las reacciones se dan en medio alcalino, en un rango de temperatura de $60^\circ C$ a $200^\circ C$ y a una presión de al menos 30 atm.



Algunas empresas que se dedican a producir ácido succínico de base petroquímica son DSM, Israel-based Gadiv Petrochemical Industries, compañías japonesas como Mitsubishi Chemical, Kawasaki Kasei Chemicals y Nippon Shokubai, y también se incluyen multitud de pequeños productores chinos como Anging Hexing Chemical y Anhui Sunsing Chemicals, además de los pequeños productores de la India (15).

1.2.2. Obtención de biotecnológica de ácido succínico.

La obtención biotecnológica está adquiriendo gran importancia. Ello se debe a los continuos incrementos en los precios del petróleo, las mejoras en las tecnologías involucradas en fermentación y purificación, y sobre todo, al potencial de este compuesto como el futuro compuesto C_4 de partida en la química orgánica industrial (5). Además, el proceso emplea dióxido de carbono a modo de sustrato, un gas de efecto invernadero.

El primer paso que tiene lugar en un proceso de fermentación es la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato gracias a la enzima hexoquinasa. Seguidamente se obtiene fosfoenol-piruvato (PEP), el cual puede seguir dos rutas metabólicas dependiendo del nivel de dióxido de carbono presente en el ambiente. Con un adecuado suministro de dióxido de carbono, se favorece la producción microbiana de ácido succínico. Por el contrario, si no está presente en cantidad suficiente, la ruta metabólica da lugar a otros productos

como formiato, etanol y acetato. La siguiente reacción que tiene lugar es la hidrogenación para producir malato, el cual se convierte en fumarato por la enzima fumarasa con eliminación de una molécula de agua. A partir del fumarato se forma el succinato en forma iónica, que es su forma común para el rango de pH típico en fermentación. Se puede formar ácido succínico cuando el ión succinato recibe un protón. El rendimiento teórico de producción de ácido succínico está estimado en 1,71 moles por mol de glucosa (16).

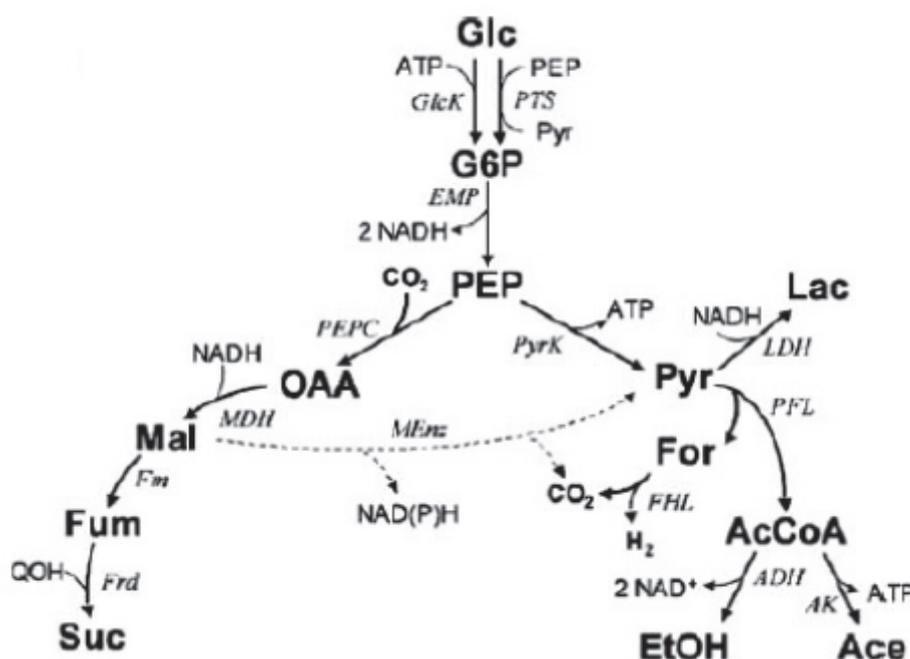


Figura 6. Esquema simplificado de la ruta metabólica de producción de ácido succínico por *E. coli* (16).

Tras la producción del ácido succínico por los microorganismos se llevan a cabo procesos de recuperación, concentración y purificación. Teniendo en cuenta que la gran parte de los costes del bioproceso recaen en la separación, es crucial encontrar un método de purificación que resulte lo más económico y a la vez eficiente posible.

Se han estudiado diversos métodos de separación, entre ellos electrodiálisis, acidificación y extracción. El más ampliamente utilizado es la electrodiálisis, en el que los componentes ionizados son separados de los no ionizados por una membrana de intercambio iónico. El ácido succínico normalmente está presente como sal ionizada de succinato, mientras que por ejemplo los

carbohidratos, proteínas y aminoácidos suelen estar no ionizados. Este proceso incrementa la concentración de ácido succínico de un 51,5 % a un 79,6 % (w/w), y elimina completamente proteínas y sales. Por otro lado es posible llevar a cabo la precipitación de sales de succinato de calcio por adición de dihidróxido de calcio, que a su vez neutraliza el caldo de fermentación y permite también la separación de ácido láctico. Con este proceso, la concentración de ácido succínico se incrementa de un 44,5 % a un 94,2 %. La extracción reactiva suele estar basada en un extractor de tipo amina, como se ha mencionado en la obtención química del ácido. En concreto, se emplean aminas terciarias hidrofóbicas, que permiten separar operando con condiciones suaves de presión y temperatura. Se basa en la reacción reversible que se da entre el extractor y el ácido carboxílico extraído. La separación se puede lograr en base al pKa de los ácidos y al pH de operación. Se ha llevado a cabo también la integración de la extracción reactiva con destilación de vapor, seguida de cristalización. Esto da lugar a una concentración del 99,76 % (w/w) y a un rendimiento de 73,09%. Este modo de trabajo es uno de los más simples y competitivos. (12)

Como ya se ha dicho, el ácido succínico puede ser el precursor de muchos compuestos de importancia industrial, como por ejemplo tetrahidrofurano, 1,4-butanodiol, γ -butirolactona y pirrolidinonas. La mayor parte de estos últimos se sintetizan actualmente vía anhídrido maleico (12).

En el año 2002, el anhídrido maleico obtenido a partir de n-butano era vendido a un precio medio de 0,977 \$/kg. Considerando la conversión global de anhídrido maleico a ácido succínico del 95 % (w/w), el mayor coste de materia prima del proceso químico se sitúa en 1,027 \$/kg de ácido succínico. Respecto a la vía biotecnológica, más de 30 millones de toneladas de glucosa son producidas anualmente en el mundo, y su precio de venta se sitúa en unos 0,39 \$/kg. Asumiendo una conversión en ácido succínico del 91 % (w/w) para la glucosa, el coste de materia prima del bioproceso se situaría en 0,428 \$/kg de ácido succínico (12).

Mientras que los precios históricos de venta del ácido succínico se encuentran entre 6-9 \$/kg (en función de su pureza), en el año 2003 el coste de ácido biosuccínico fue de entre 0,55-1,10 \$/kg, lo que mostraba una creciente competitividad. (9)

El mercado potencial de ácido succínico y sus derivados se estimó en más de 270000 toneladas al año ya en el 2004 (17).

A partir del año 2008, después de los picos en el precio del petróleo del año 2007, diversas empresas empezaron a interesarse por la producción

biológica del ácido succínico, como por ejemplo la Joint Venture Bio Amber en Pomacle, Francia; o Myriant en Lake Providence, Louisiana, EEUU (9).

La evaluación del costo de la materia prima y la estimación del tamaño del mercado muestran claramente como el proceso tradicional de obtención de ácido succínico será reemplazado por el sistema biotecnológico en un futuro próximo. La producción mundial de ácido succínico ha tenido un crecimiento anual del 10 % desde las 15000 toneladas que se producían en 1999, básicamente de base petroquímica. Este crecimiento se ha debido a la producción por vía biotecnológica, pues la petroquímica se ha mantenido estable (9).

1.2.2.1. Microorganismos productores de ácido succínico

El bioproceso consiste en una fermentación microbiana a partir de distintas fuentes de glucosa.

No está muy descrito en la literatura el empleo de hongos como organismos productores, aunque sí es conocido el uso de *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Penicillium simplicissimum*, los cuales son capaces de excretar ácido succínico. En el caso por ejemplo de *P. simplicissimum*, es capaz de producir succinato y citrato bajo condiciones anaerobias y aerobias. Operando en anaerobio se observa un incremento en la producción de succinato, pues aunque la concentración intracelular aumente para ambos compuestos, la excreción sólo se ve aumentada en el succinato (5).

En cuanto a las bacterias, la elección del microorganismo puede ser muy variada, aunque en la mayoría de los casos descritos en la literatura se utilizan microorganismos capnofílicos, es decir, aquellos que para crecer en forma óptima necesitan elevadas concentraciones de dióxido de carbono. Las bacterias utilizadas en la producción no natural (modificadas genéticamente), sin embargo, se eligen en base a su accesibilidad genética. Las cepas más empleadas son *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* y *Escherichia coli*. Cepas más actuales son por ejemplo *Corynebacterium sp.* y *Bacteroides fragilis* (5).

Las cepas *A. succinogenes*, *A. succiniciproducens*, *M. succiniciproducens* y *B. fragilis* son productoras naturales de ácido succínico. Son todas Gramnegativas, aisladas de ambientes anaerobios como el rumen de los rumiantes. Realizan un tipo de fermentación llamada ácido-mixta, en la que además de ácido succínico se producen etanol, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, alcoholes, etc. Las condiciones anaerobias del rumen, causadas por la presencia de dióxido de carbono, metano y trazas

de hidrógeno, crean un ambiente propicio para la producción microbiana de ácido succínico (5). Como además son capnofílicas, pueden crecer con altas concentraciones de dióxido de carbono, que de hecho utilizan como fuente de carbono junto a azúcares. En la literatura se han descrito producciones de hasta 110 g/L de ácido succínico, productividades de 1,8 g/Lh y rendimientos de 1,2 moles succinato/moles glucosa, valor cercano al máximo teórico, 1,71 (7). Incrementos de estos valores requieren el uso de técnicas de ingeniería metabólica que mejoren las cepas productoras, para lo cual se requieren las herramientas genéticas apropiadas.

En las últimas décadas una de las tecnologías clave ha sido la ingeniería metabólica, basada en la aplicación del diseño, la ingeniería y la optimización a los microorganismos, para así optimizar el proceso de obtención de distintos productos a partir de fuentes renovables. Para la aplicación de ingeniería metabólica se debe contar con las herramientas genéticas o al menos suficiente información sobre las rutas que puede seguir el microorganismo, cosa que no siempre es posible con las cepas productoras naturales (5). Mientras que las cepas productoras naturales emplean una ruta para la obtención del ácido succínico, las desarrolladas con ingeniería metabólica pueden utilizar varias, por ejemplo *E. coli* dispone de seis rutas de síntesis diferentes. El uso de una cepa no natural implica un proceso que dirija el flujo de carbono predominantemente hacia el ácido succínico, y que al mismo tiempo cancele otras rutas competitivas. Estas técnicas han dado lugar a cepas recombinantes de *E. coli* capaces de producir 50 g/L de ácido succínico (7).

Las principales bacterias productoras son las siguientes:

Mannheimia succiniproducens

Es una bacteria anaerobia facultativa, capnofílica, mesofílica, Gram-negativa y similar a la *A. succinogenes* (5).

Lleva a cabo el proceso de fermentación en una amplia variedad de sustratos, pero tiene como desventaja la auxotrofia que presenta (necesidad de vivir en presencia de una sustancia porque el organismo es incapaz de sintetizarla) (5).

A diferencia de *A. succinogenes*, *M. succiniproducens* lleva a cabo el ciclo de Krebs completo. Puede crecer eficientemente en condiciones aerobias o anaerobias. Su metabolismo da lugar a ácido succínico como producto mayoritario, y a los ácidos acético y fórmico como subproductos principales, en condiciones de flujo de dióxido de carbono y pH entre 6,0-7,5 (5,12).

Se ha visto que es posible una producción económica y eficiente a través de un medio de fermentación basado en suero lácteo y que contenga licor de maíz en lugar de extracto de levadura. También puede emplearse xilosa, lo que hace posible el aprovechamiento de madera hidrolizada, reduciendo así el coste de materia prima. Esto sugiere que *M. succiniproducens* sí que puede ser un buen candidato para su empleo industrial en el aprovechamiento de recursos renovables (12).

Anaerobiospirillum succiniproducens

Se trata de una bacteria anaerobia estricta, capnofílica, mesofílica, pleomórfica, Gram-negativa y un patógeno oportunista (5).

La composición requerida de su medio de crecimiento indica que ésta cepa es auxotrófica para muchos aminoácidos y vitaminas. En la mayoría de los casos se requiere extracto de levadura y peptona, que dan lugar a considerables valores de rendimiento y producción. Con ella se lleva a cabo el aprovechamiento de licor de maíz (5).

A. succiniproducens fue aislada de la garganta y heces de los perros Beagle. Produce ácido succínico como producto mayoritario, y etanol y ácido acético como minoritarios bajo condiciones estrictamente anaerobias. Pertenece a la familia *Succinivibrionaceae*. Utiliza la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) para producir ácido succínico. Los factores ambientales críticos para la producción de ácido succínico y para el crecimiento del microorganismo son

la presencia de dióxido de carbono, el pH, una fuente externa que proporcione electrones y diversos compuestos del medio. El suministro de hidrógeno como donante de electrones incrementa tanto el rendimiento hacia el ácido succínico como la productividad. Se ha visto además que el suministro de biotina incrementa el consumo de glucosa (12).

Este microorganismo puede emplear como fuentes de carbono glucosa, glicerol, sacarosa, maltosa, lactosa y fructosa. Se ha visto que el uso de glicerol en lugar de glucosa da lugar a un incremento en el rendimiento del ácido succínico, y un aumento de la selectividad respecto al ácido acético. También en este caso es posible el aprovechamiento de suero lácteo, licor de maíz, etc. (12).

Escherichia coli

Es una bacteria caracterizada por su abundancia en la naturaleza y su pequeño tiempo de duplicación. Las herramientas de ingeniería genética son en este organismo más fáciles de aplicar y permiten diversos procesos de producción (5).

En condiciones aeróbicas, se produce acetato. En condiciones anaeróbicas, *E. coli* en su forma natural puede fermentar en glucosa, produciendo etanol, ácido fórmico, acético y láctico, con pequeñas cantidades de ácido succínico. El rendimiento del ácido succínico en glucosa no suele superar el valor de 0,2 mol/mol. *E. coli* es capaz de utilizar seis rutas diferentes para producir ácido succínico, y a diferencia de los otros microorganismos explicados, en ella la enzima PEP carboxikinasa juega un papel secundario (12).

Se han desarrollado estrategias para aumentar la producción de ácido succínico, como la inactivación de enzimas participantes en las reacciones que compiten con las de formación de ácido succínico, o la introducción de enzimas heterólogas y la sobreexpresión de aquellas que catalizan reacciones hacia una mayor producción de nuestro producto de interés (12).

Actinobacillus succinogenes

Es la bacteria utilizada en el presente proyecto, de la que se hablará en el apartado 3 de la Introducción.

En la literatura también se describe la posible combinación hongo-bacteria en dos pasos con *Rhizopus sp.* y *Enterococcus faecali*, que da lugar a elevados valores de productividad y de rendimiento (2,2 g/Lh y 0,95 g/g, respectivamente). En el primer paso el hongo produce fumarato, el cual es transferido a un segundo reactor donde la bacteria lo convierte en ácido succínico. Este proceso en dos etapas muestra el problema de la formación de succinato en organismos eucariotas. Para ser excretado, el succinato debe de cruzar la membrana mitocondrial y la membrana citoplasmática, mientras que el fumarato no. Esto hace más favorable el uso de bacterias en lugar de hongos o levaduras para la producción de ácido succínico. Pero por otro lado, los hongos y levaduras son capaces de crecer a un pH más ácido que las bacterias (5).

Cepa	Fermentación	Sustrato	t (h)	X (g/L)	AS (g/L)	Y (g/g)	p (g/Lh)
A. succinogenes	Repetición-batch	Glucosa	38,5	a	34	0,86	0,88
130Z	Batch	Glucosa	84		66	0,67	0,79
FZ53	Batch	Glucosa	78		106	0,8	1,34
M. Succiniciproducens	Batch	Glucosa	7,5	3,44	14	0,7	1,87
	Batch	Suero	11	3,3	14	0,72	1,22
A. Succiniciproducens	Continuo	Suero	11,8		24	0,72	2,1
	Fed-batch	Glucosa + glicerol	22	OD660	30	0,97	1,35
	Batch	Glucosa	30	OD660	33	0,93	1,1
E.coli recombinante							
AFP111 (pTrc99A- <i>pyc</i>)	Doble fase fed-batch	Glucosa	76	10,2	99	1,1	1,3
HL27659K	Fed-batch	Glucosa	59	OD600	58	0,55	0,98

a: La concentración de células fue representada como densidad óptica mediante la medida de absorbancia. b: mg OD⁻¹h⁻¹.

Tabla 2. Producción de ácido succínico por diversos microorganismos (12). t, tiempo; X, biomasa; AS, ácido succínico; Y, rendimiento; P, productividad.

2. ÁCIDO LÁCTICO

2.1. Características y usos

El ácido láctico ($C_3H_6O_3$), o ácido 2-hidroxipropanoico, es un compuesto con importantes aplicaciones en la industria alimentaria, del plástico, del cuero, farmacéutica, cosmética, textil y química. Puede ser producido por vía química o biotecnológica (18).

Fue descubierto en 1780 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele, quien lo consideró como un componente de la leche. En 1857 Louis Pasteur descubrió que no se trataba de un componente, sino de un metabolito producido por fermentación (19).

Es un ácido carboxílico que posee un grupo hidroxilo adyacente al grupo carboxilo, como se ve en la Figura 7. En solución, puede producirse la pérdida de un protón del grupo ácido, dando lugar al ión lactato. Las propiedades físicas se muestran en la Tabla 3.

Número CAS	598-82-3
Estado físico	Líquido viscoso
Color	Incoloro o amarillento
pH	2,4 (solución 0,1 N, 25°C)
Punto de fusión	L: 53°C D: 53°C D/L: 16,8°C
Punto de ebullición	122°C a 14 mmHg
Densidad	1,209 g/mL a 25°C
Solubilidad en el agua	Miscible
pKa	3,89

Tabla 3. Propiedades físicas del ácido láctico (20,21)

Posee actividad óptica debido a que tiene un carbono asimétrico. Existen por tanto dos isómeros ópticos, el D(-)-láctico y el L(+)-láctico. El isómero con importancia biológica es L(+)-láctico, que puede ser metabolizado por el ser humano.



Figura 7. Estructura química del L(+)-láctico y del D(-)-láctico.

El ácido láctico es uno de los ácidos orgánicos más importantes. Sus aplicaciones tradicionales son numerosas, entre las que destacan la alimentaria, farmacéutica, cosmética y la relativa a la industria química. Han surgido también otras nuevas, como son la obtención de polímeros biodegradables.

Food industry			
<ul style="list-style-type: none"> - acidulants - preservatives - flavours - pH regulators - improving microbial quality - mineral fortification 			
Cosmetic industry	<div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 100px; height: 100px; display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin: 0 auto;"> <div style="text-align: center;"> <p>Lactic acid</p> <p>(CH₃CHOHCOOH)</p> </div> </div>	Chemical industry	Chemical feedstock
<ul style="list-style-type: none"> - moisturizers - skin-lightening agents - skin-rejuvenating agents - pH regulators - anti-acne agents - humectants - anti-tartar agents 		<ul style="list-style-type: none"> - descaling agents - pH regulators - neutralizers - chiral intermediates - green solvents - cleaning agents - slow acid release agents - metal complexing agents 	<ul style="list-style-type: none"> - propylene oxide - acetaldehyde - acrylic acid - propanoic acid - 2,3-pentanedione - ethyl lactate - dilactide - poly(lactic acid)
Pharmaceutical industry			
<ul style="list-style-type: none"> - parenteral/I.V. solution - dialysis solution - mineral preparations - tablettings - prostheses - surgical sutures - controlled drug delivery systems 			

Figura 8. Usos y aplicaciones del ácido láctico y sus sales (19).

Industria alimentaria

Este sector constituye más del 85% de la demanda de ácido láctico. El isómero L(+) es el deseado en esta industria debido a la presencia de la enzima L(+) lactato deshidrogenasa en el ser humano, que permite metabolizarlo. Se utiliza habitualmente como aditivo alimentario: se añade a la margarina, mantequilla, yogures, etc. con objeto de mejorar el sabor; se utiliza como agente gelificante para mermeladas y jaleas; el lactato de calcio se añade a ciertas bebidas como suplemento mineral; tanto el ácido láctico como sus sales pueden incrementar la vida útil de productos alimenticios como salchichas, jamones y pescado; se emplea para producir geles emulsionantes en productos de panadería; etc. (22).

Industria farmacéutica y cosmética

En este caso la forma enantiomérica empleada es también la L(+). Se utiliza en la producción farmacéutica para ajustar el pH de ciertos medicamentos y a modo de electrolito en soluciones destinadas a reponer fluidos corporales, por ejemplo la solución empleada en diálisis. El ácido láctico también se emplea en una amplia variedad de preparaciones como prótesis y sistemas de liberación controlada de fármacos. El lactato de calcio se puede emplear en terapia contra la deficiencia de calcio y como agente anti-caries (19,23)

En el campo de la cosmética, el ácido láctico forma parte de pomadas, lociones, soluciones antiacné, etc., pues tiene propiedades tales como actividad antimicrobiana e hidratación de la piel. El efecto hidratante se relaciona con la capacidad de retención de agua del lactato (19).

Industria química

El ácido láctico es empleado como agente descalcificante, regulador del pH, neutralizador, intermediario quiral, disolvente, agente de limpieza, agente ácido de liberación lenta, agente complejante del metal, agente antimicrobiano y humectante. Es adecuado como material de partida en la producción de herbicidas. Su propiedad descalcificante da lugar a aplicaciones como limpiadores de baño, máquinas de café, etc. (19).

Se considera el monómero con más potencial, pues al contener dos grupos funcionales reactivos (el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo) puede someterse a una variedad de transformaciones químicas, dando lugar a productos útiles (24):



- Óxido de propileno, a través de hidrogenación.
- Acetaldehído, a través de descarboxilación.
- Ácido acrílico, a través de deshidratación.
- Ácido propanoico, a través de reducción.
- 2,3-pentanodiona, a través de condensación
- Lactida, a través de autoesterificación.

Polímeros biodegradables, ácido poli-láctico (PLA)

Las propiedades físicas de este derivado dependen de la pureza óptica que tenga el ácido láctico de partida. Por ejemplo el ácido poli-D,L-láctico es un polímero amorfo, con aplicaciones tales como la administración de fármacos en los casos en que es importante tener dispersión homogénea de las sustancias activas dentro de una matriz. Sin embargo, se prefiere el ácido poli-L-láctico, que es semicristalino, en aplicaciones donde se requiere una alta resistencia mecánica y tenacidad (suturas y dispositivos ortopédicos) (25).

Otras aplicaciones son ropa de protección, envasado de alimentos, bolsas de basura, contenedores rígidos, etc. (19).

2.2. Obtención

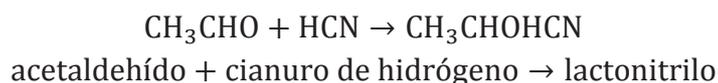
Existen dos rutas de obtención de ácido láctico, la química y la biotecnológica. La obtención química presenta la desventaja de que no es estereoselectiva, pues se obtiene una mezcla racémica con propiedades distintas a las de los enantiómeros por separado. A través de la ruta biotecnológica, puede producirse el isómero deseado, bien L(+) o D(-).

2.2.1. Obtención química de ácido láctico

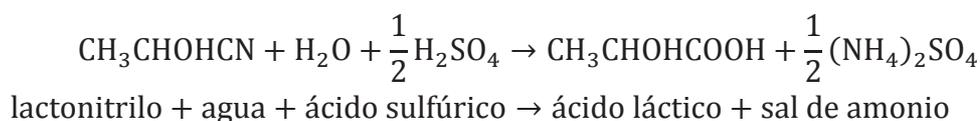
La obtención química está formada por varios pasos. Se parte de compuestos fósiles que son convertidos a etileno, el cual es oxidado dando lugar a acetaldehído. El acetaldehído reacciona con cianuro de hidrógeno en presencia de una base para producir así lactonitrilo. Esta reacción transcurre en fase líquida, con presencia de catalizador y a elevada presión. El lactonitrilo crudo es recuperado y purificado por destilación. Luego es hidrolizado a ácido láctico, ya sea por HCl concentrado, o por H₂SO₄ para

producir la correspondiente sal de amonio y ácido láctico. El ácido láctico es esterificado con metanol para producir metil lactato, que es separado y purificado por destilación e hidrolizado con agua en presencia de catalizador ácido, obteniendo así ácido láctico y metanol, el cual es recirculado. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes (26):

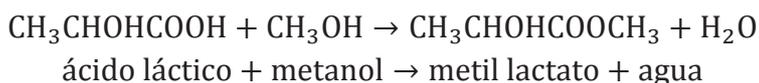
1. Adición de cianuro de hidrógeno (reacción catalizada)



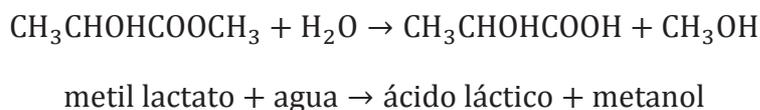
2. Hidrólisis con H_2SO_4



3. Esterificación



4. Hidrólisis con agua.



Existen otras rutas químicas para la obtención de ácido láctico. Algunas de ellas son la oxidación de propilenglicol, la reacción de acetaldehído con monóxido de carbono y agua a elevadas condiciones de presión y temperatura, la hidrólisis de ácido cloropropiónico y la oxidación con ácido nítrico del propileno. Sin embargo, ninguno de estos procesos está comercializado (26).

2.2.2. Obtención biotecnológica de ácido láctico

A través de esta ruta, es posible obtener una forma enantioméricamente pura en función del microorganismo utilizado. El proceso de fermentación se caracteriza por la degradación de un sustrato (glucosa) por parte de microorganismos, dando lugar a metabolitos como etanol, ácido cítrico y ácido láctico.

Las bacterias productoras de ácido láctico pueden ser en esencia de dos tipos, homofermentativas y heterofermentativas.

Las homofermentativas convierten glucosa exclusivamente en ácido láctico metabolizándola con la ruta Embden-Meyerhof o glucólisis. Dos moléculas de ácido láctico se producen por cada molécula de glucosa, con un rendimiento superior a 0,9 g/g. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* (27).

Las heterofermentativas producen ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono (19). La proporción etanol-ácido acético depende del potencial redox del sistema. La heterofermentación puede ser llevada a cabo por bacterias heterofermentativas facultativas, como *Lactobacillus casei*, en el caso de metabolizar pentosas. También la llevan a cabo las heterofermentativas estrictas cuando metabolizan tanto pentosas como hexosas, y es el caso de organismos del género *Leuconostoc*, así como *Lactobacillus brevis* o *Lactobacillus fermentum* (28).

Los microorganismos homofermentativos pueden dar lugar a una mezcla de ácidos durante un período de limitación en glucosa, durante el crecimiento en otros azúcares como maltosa o lactosa, y tras un aumento de pH o una disminución de temperatura. Aunque se sigue la vía homofermentativa, en el metabolismo del piruvado además de obtenerse ácido láctico se produce ácido fórmico y acetil-CoA. En condiciones anaerobias, no tiene lugar la producción de ácido fórmico, sino la de NADH (28).

Los tres tipos de rutas pueden verse en la Figura 9.

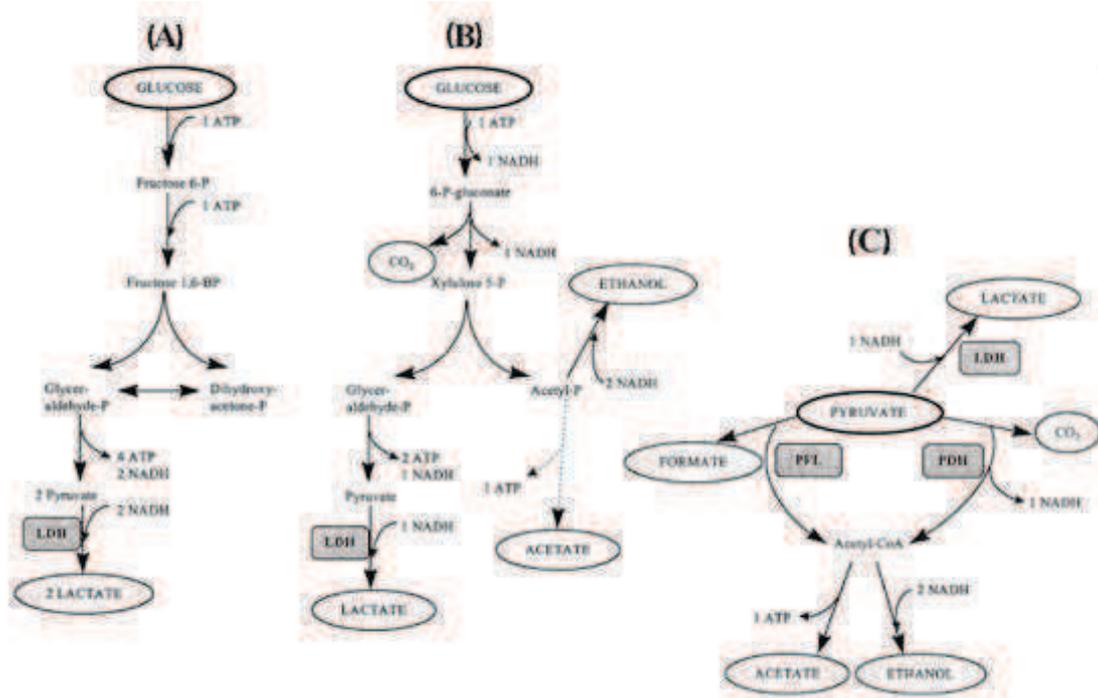
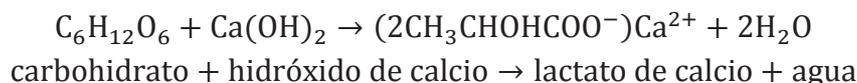


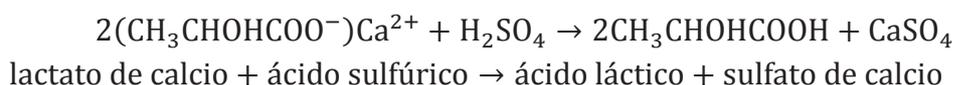
Figura 9. Rutas metabólicas de bacterias productoras de ácido láctico. Homofermentación (A), heterofermentación (B) y fermentación ácido mixta (C). P: fosfato, BP: bifosfato, LDH: lactato deshidrogenasa, PFL: piruvato formiato liasa, y PDH: piruvato deshidrogenasa (28).

Tras la fermentación tiene lugar un proceso de recuperación y purificación. El caldo final contiene una mezcla de ácidos y sales. La producción de ácido láctico da lugar a una disminución del pH del medio, lo que afecta a la productividad del microorganismo debido a un efecto inhibitorio. Para mantener el pH en su valor deseado, se suele recurrir a la adición de hidróxido de calcio, lo que da lugar a la conversión de ácido láctico a lactato de calcio, evitando el problema. El lactato de calcio es filtrado eliminándose las células, tratado con carbón, evaporado y acidificado con ácido sulfúrico obteniéndose ácido láctico y sulfato de calcio. Éste es insoluble, por lo que se elimina con filtración. El ácido láctico se obtiene tras los procesos de hidrólisis, esterificación, destilación e hidrólisis de nuevo (26).

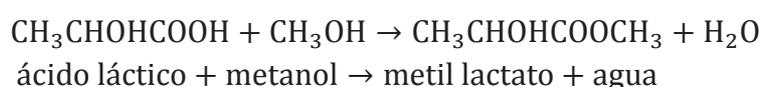
1. Fermentación y neutralización



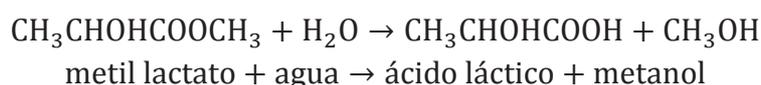
2. Hidrólisis con H₂SO₄



3. Esterificación



4. Hidrólisis con agua



De forma alternativa, el ácido láctico puede ser separado y purificado con otros métodos como son la adsorción, la extracción con disolvente o la separación con membrana (26).

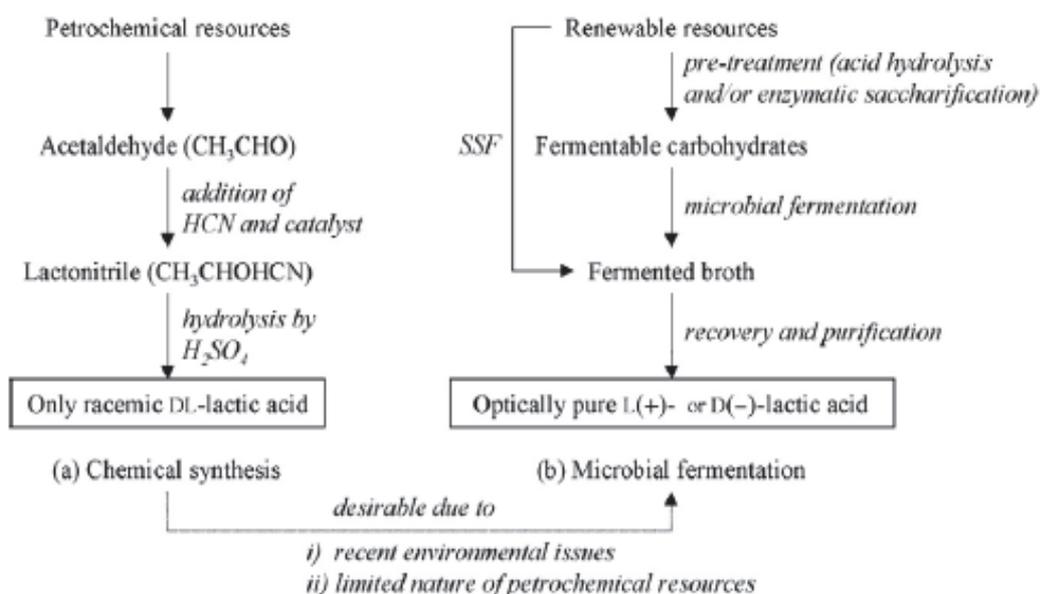


Figura 10. Esquema de los dos métodos de obtención de ácido láctico, síntesis química (a) y fermentación microbiana (b). SSF representa la sacarificación y fermentación simultáneas (19).

2.2.2.1. Microorganismos productores de ácido láctico

Los productores más importantes son las bacterias ácido lácticas y los hongos filamentosos del género *Rhizopus*.

Microorganismo	Acido láctico (g/L)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/Lh)
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 52311	83	0,88	2,6
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	104,6	0,87	1,8
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	144	0,96	5,1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	67	0,84	2,5
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	65,5	0,66	2,7
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL B-548	38,7	0,9	3,5
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	82	0,91	5,6
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 21028	41	0,97	1
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	21,8	0,77	0,8
<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	76,2	0,7	0,8
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIMB 8130	90	0,97	3,8
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> IFO 12007	90	0,76	1,6

Tabla 4. Microorganismo utilizados habitualmente en investigación para la producción de ácido láctico (19).

Los hongos poseen distintas morfologías de crecimiento, como el micelio individual, micelio granular, flóculos o pellets. La producción de ácido láctico se ve afectada por la forma que adquieran los hongos en su crecimiento. Estudios llevados a cabo con *R. arrhizus* mostraron que el cambio de morfología filamentosa a pellets ocasiona una disminución de la productividad del ácido láctico de 75,3% a 62,6%. Con el cultivo de *R. oryzae* se comprobó que la producción de ácido láctico mejoraba al ser inducida la forma micelial. En el caso de *Rhizopus spp.* se induce la morfología de pellets pequeños y sueltos (27).

La fermentación con hongos tiene la ventaja de requerir un medio simple para producir ácido láctico, como aguas residuales que contienen fécula de patata utilizando *R. oryzae* y *R. arrhizus*. En el caso de *Rhizopus spp.*, la fuente de carbono suele ser la glucosa o el almidón (27).

Sin embargo, los hongos no dan lugar a una productividad ni a una producción elevada, probablemente debido a las limitaciones de transferencia de masa que tienen lugar y a la formación de subproductos como el etanol o el ácido fumárico (29).

De utilizar bacterias, se prefiere que sea termófilas, de fermentación rápida, que metabolicen sustratos baratos y que presenten poca producción de biomasa y de subproductos. Los géneros más estudiados son *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (27). El enantiómero L(+) puede ser producido de forma pura por *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactococcus lactis*, mientras que el enantiómero D(-) lo producen especies como *Lactobacillus delbrueckii* (18).

Como se muestra en la Tabla 5, hay casos en que se produce un enantiómero con alta pureza pero el rendimiento es bajo, por ejemplo en *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010, que produce el enantiómero L(+) con pureza del 98% pero el rendimiento es del 0,67 (g/g azúcar consumido). También puede darse el caso contrario, pues *Lactobacillus plantarum* A6 es capaz de producir ácido láctico con un rendimiento de 0,84 (g/g azúcar consumido) pero sin embargo se obtiene una mezcla de enantiómeros que carece de aplicación para la síntesis de polímeros. *Streptococcus bovis* 148 fue capaz de producir el enantiómero L(+) con rendimiento del 0,88 (g/g azúcar consumido) y pureza óptica del 95,6% (18).

Para mejorar la productividad del ácido láctico y la pureza óptica se ha recurrido a ingeniería genética, obteniendo así nuevas cepas como las citadas en la tabla 5. Otros ejemplos son *Lactobacillus lactis* NCIM 2368, *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365, *Lactobacillus delbrueckii* Mutant Uc-3, *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 y *P. stipitis* (27).

Cepa	Sustrato	S ₀ (g/L)	S (g/L)	AL (g/L)	I	Pureza óptica (%)	Y (g/g)	P (g/Lh)
Naturales								
<i>L. manihotivovans</i> LMG 18010	Almidón soluble	17,5		12,6	L	98	0,67	0,5
<i>L. plantarum</i> A6	Almidón soluble	17,1		15,2	D/L	14	0,84	2,1
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	Glucosa	100	3,7	86	D/L	12,6	0,89	4,51
<i>S. bovis</i> 148	Almidón crudo	20	3,8	14,7	L	95,6	0,88	
Recombinantes								
<i>L. lactis</i> IL 1403/pCUSαA	Almidón soluble	20	2,6	15,6	L	99,2	0,89	1,57
<i>L. plantarum</i> Δ <i>dhL1</i>	Glucosa	100	3,3	86,6	D	99,7	0,89	4,54
<i>L. plantarum</i> Δ <i>dhL1</i> /pCUSαA	Almidón crudo	100	13,8	73,2	D	99,6	0,85	3,86
<i>L. plantarum</i> Δ <i>dhL1</i> /pCU-Ce1A	Cellohexaose	2		1,27	D	99,5		
<i>L. plantarum</i> Δ <i>dhL1</i> /pCU-Ce1A	β-glucano	2		1,47	D	99,7		

Tabla 5. Parámetros de fermentación de bacterias productoras de ácido láctico, naturales y recombinantes (18). S₀, concentración de sustrato inicial; S, concentración de sustrato final; AL, ácido láctico; I, isómero; Y, rendimiento; P, productividad.

La elección del microorganismo depende en gran parte del carbohidrato que va a ser fermentado. *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *delbreuckii* fermenta sacarosa, *Lactobacillus delbreuckii* ssp. *bulgaricusus* fermenta lactosa, *Lactobacillus helveticus* puede fermentar lactosa y galactosa, *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus amylovirus* fermentan almidón, *Lactobacillus lactis* puede fermentar glucosa, sacarosa y galactosa, *Lactobacillus pentosus* puede fermentar licores ricos en sulfitos, etc. (27)

La producción biotecnológica de ácido succínico y de ácido láctico presenta como principales ventajas un menor gasto energético, pues las condiciones de operación son suaves (1 atm, 37°C). Además, a diferencia de la química, no depende de fuentes fósiles y emplea dióxido de carbono. En cuanto a los residuos tóxicos, la vía biotecnológica produce menos que la química, de hecho en ocasiones se sirve de ellos.

Por otro lado, para una producción a nivel industrial, se requieren elevados volúmenes y tiempos de fermentación, lo que implica elevados volúmenes de disoluciones de sales las cuales pueden acarrear ciertos problemas ambientales. También suponen una desventaja las operaciones de separación y purificación, que aumentan el coste de producción. Las reacciones de fermentación pueden presentar inconvenientes debido al hecho de que las células son organismos vivos, y como tal pueden darse fenómenos como la inhibición, lo que frena su crecimiento y producción.

Estas ventajas y desventajas se esquematizan en la Tabla 6.

	Producción petroquímica	Producción biotecnológica
Origen	Materia prima no renovable (compuestos del petróleo)	Materia prima de base biológica (carbohidratos)
Coste	Más barato que las fuentes renovables	Etapa de separación con alto coste
Rutas	Rutas desarrolladas Tecnología establecida	Nuevas tecnologías
Rendimiento	Alto	Hay productos secundarios Bajas concentraciones Elevado tiempo de reacción
Desventajas	Se espera que la disponibilidad disminuya con el tiempo Alta demanda energética Problemas de eliminación del catalizador	Sensibilidad de los microorganismos Nutrientes requeridos Proceso de recuperación complicado Residuos
Opinión pública	Disminución de la popularidad	Aumento del interés

Tabla 6. Comparación entre obtención química y biológica (6).

3. Actinobacillus succinogenes

3.1. Características

Se trata de una bacteria anaerobia facultativa, capnofílica, mesofílica, pleomórfica, Gram-negativa y miembro de la familia *Pasteurellaceae* (5).

Actinobacillus succinogenes puede llevar a cabo fermentación a partir de un amplio número de fuentes, lo que supone una ventaja, pues permite el aprovechamiento de compuestos como suero lácteo o trigo, mucho más baratos que un azúcar refinado o glucosa. Sin embargo, la abundante presencia de vitaminas y aminoácidos en el rumen da lugar a que ciertas rutas biosintéticas se pierdan en el caso de falta de estos nutrientes en el medio (5).

Entre las fuentes de carbono que *A. succinogenes* puede emplear se encuentran la arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manosa, manitol, sorbitol, sacarosa, xilosa o salicina bajo condiciones anaerobias. A diferencia de *E. coli* o *A. succiniciproducens*, *A. succinogenes* tiene una buena tolerancia a altas concentraciones de glucosa, lo cual es un punto a favor en la fermentación (12).

3.2. Rutas metabólicas

3.2.1. Rutas anaerobias

Como se ve en la Figura 11, no se lleva a cabo un ciclo de Krebs completo. También vemos que la carboxilación del fosfoenolpiruvato, que es un paso muy importante en la formación de ácido succínico, está fuertemente regulada por los niveles de dióxido de carbono. Teóricamente, se requiere un mol de dióxido de carbono para producir un mol de ácido succínico. Cuando hay altos niveles de este gas en el medio, tiene lugar un incremento en la producción de ácido succínico a expensas de etanol y ácido fórmico. Esto se debe a un incremento de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) a oxaloacetato en lugar de pasar a piruvato. La adición de donadores de electrones adicionales, como por ejemplo hidrógeno, también dio lugar a un incremento en la concentración de ácido succínico. Es por ello, que el uso de azúcares más reducidos como arabitol, manitol y sorbitol da lugar a un incremento en la producción de ácido succínico y etanol en comparación con otros azúcares como la glucosa (12).

La cepa *A. succinogenes* 130Z y sus cepas variantes (FZ6, 9, 21, 45 y 53) son capaces de producir grandes cantidades de ácido succínico, y son más resistentes a él que otros productores. Las cepas que han sido modificadas son capaces de producir menos etanol, ácido acético, ácido fórmico y ácido láctico, lo que minimiza los costes de separación del ácido succínico del caldo de fermentación. Para ello es necesaria una exhaustiva información genética del microorganismo así como herramientas genéticas (12).

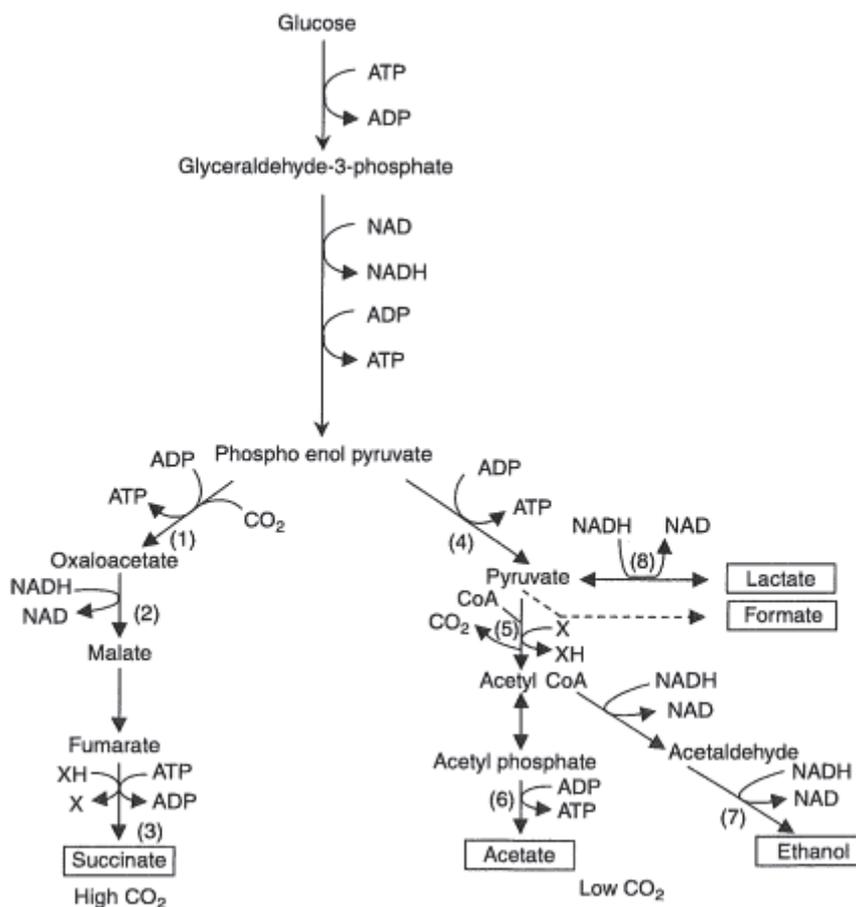


Figura 11. Ruta metabólica de fermentación de la glucosa en *Actinobacillus succinogenes*. Pasos: 1: fofenolpiruvato carboxiquinasa, 2: malato deshidrogenasa, 3: fumarato reductasa, 4: piruvato quinasa, 5: piruvato ferredoxin oxidorreductasa, 6: acetato quinasa, 7: alcohol deshidrogenasa, 8: lactato deshidrogenasa (30).

3.2.2. Rutas aerobias

No hay muchos estudios sobre la producción de ácido láctico por parte de *Actinobacillus succinogenes*. A pesar de ello, se ha determinado que un cultivo en doble fase permite alcanzar elevado rendimiento y producción de ácido láctico. Este cultivo se basa en un primer período de fermentación en condiciones aerobias seguido de un período anaerobio con flujo de dióxido de carbono. Mediante esta técnica se modifica la ruta metabólica desde el piruvato hacia el lactato (31).

Se ha visto que el suministro de dióxido de carbono y de medio buffer son de vital importancia en la producción de ácido láctico cuando se opera con una doble fase. Para controlar el pH se suele emplear carbonato de sodio durante el período aerobio, que de alguna manera sustituye al dióxido de carbono. Durante el período anaerobio con flujo de dióxido de carbono, una disolución de hidróxido de sodio es la encargada de mantener el pH en el valor deseado (32).

Otros estudios en condiciones aerobias han demostrado que *A. succinogenes* puede llevar a cabo su metabolismo a partir de glicerol. El aprovechamiento resulta interesante, pues obtenemos el producto deseado a partir de un subproducto de la fabricación del biodiesel, que además es de fácil almacenamiento, y que da lugar a un alto rendimiento. Estos estudios se hicieron en presencia de extracto de levadura, que elimina gran parte de las limitaciones asociadas al hecho de que se está metabolizando glicerol, que es una molécula altamente reducida. Se vio que la presencia de nitrato inhibe la producción de succinato por inhibición de la enzima fumarato reductasa, y que sin embargo la presencia de dimetilsulfóxido y condiciones microaeróbicas permiten altos rendimientos de succinato. Con microcultivos aeróbicos continuos, se obtuvo un rendimiento de succinato de 0,75 mol/mol glicerol, que es un 75 % del máximo rendimiento teórico (33).

Se suelen utilizar hexosas como sustrato, pero *A. succinogenes* también es capaz de metabolizar compuestos C₄, como el fumarato, y puede hacerlo tanto en condiciones aerobias como anaerobias. El crecimiento a partir de fumarato en condiciones anaerobias es estimulado con la presencia de glicerol, y como producto mayoritario se obtiene el succinato. En condiciones aerobias, el fumarato se oxida a acetato (34).

3.3. Materias primas

3.3.1. Carbohidratos

Los carbohidratos más frecuentemente utilizados como fuente de carbono en la fermentación por *Actinobacillus succinogenes* son la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y la lactosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$).

En el presente trabajo se han llevado a cabo ensayos con ambos carbohidratos, individualmente y en co-fermentación.

3.3.2. Polialcoholes

También es posible la utilización de polialcoholes como fuente de carbono. Destacan entre ellos el glicerol y el manitol. Los estudios que emplean como sustrato glicerol han sido desarrollados en condiciones aerobias, mientras que lo que emplean manitol se desarrollan en condiciones anaerobias. El manitol da lugar a concentraciones de ácido succínico superiores a los sustratos habituales (33,35).

En el presente trabajo se han llevado a cabo ensayos con ambos polialcoholes.

3.3.3. Naturales: valorización de subproductos/residuos industriales

El interés por el aprovechamiento de la biomasa y de sus compuestos derivados como materias primas industriales está creciendo día a día. La biomasa y el dióxido de carbono son considerados como fuentes primarias renovables de carbono. Su utilización supone una alternativa sostenible ante el constante agotamiento de las fuentes fósiles, que son las habitualmente empleadas para producir compuestos químicos de interés (9).

Entre las materias primas que han resultado adecuadas para el proceso de fermentación, destaca la melaza de caña, el suero de leche, el glicerol, hidrolizados lignocelulósicos y cereales (6).

Glucosa: valorización de material lignocelulósico, de material almidonado y de melaza de caña

A la biomasa lignocelulósica se le puede aplicar un tratamiento primario (fermentativo, de hidrólisis, térmico o catalítico) que dará lugar a diferentes compuestos orgánicos, como azúcares, furfural, 5-hidroximetil furfural, y numerosos ácidos (ácido levulínico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido 3-hidroxi propiónico, etc.). El procedimiento a seguir con la biomasa lignocelulósica (preferiblemente de alto contenido en celulosa) consiste en un primer paso de separación de la lignina. La porción celulósica (almidón, insulina, celulosa, hemicelulosa, etc.) puede hidrolizarse en medio ácido dando lugar a mono- y disacáridos. Pueden hacerse reaccionar con alcoholes alifáticos para sintetizar alquil-glicósicos, útiles como surfactantes. Las hexosas y pentosas pueden ser reducidas con hidrógeno en presencia de catalizadores de metales nobles soportados, dando lugar a sorbitol, xilitol y/o arabitol, que pueden ser utilizados en la industria alimentaria, de farmacia y como componentes para la producción de surfactantes. Por otro lado los monosacáridos pueden oxidarse con oxígeno o aire en presencia de catalizadores metálicos produciendo ácidos derivados, como el ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido glucónico, etc. (9).

Destaca el aprovechamiento de los monosacáridos (principalmente glucosa) en procesos de fermentación aerobia y anaerobia, lo que permite producir un amplio rango de ácidos derivados (ácido láctico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido 3-hidroxi propiónico, etc.) en función del microorganismo utilizado. Estos ácidos son intermediarios químicos relevantes en la producción de compuestos de alto valor añadido (9).

El hidrolizado no tratado puede ser usado, pero la productividad se reduce a aproximadamente la mitad respecto al material tratado (6).

En cuanto al aprovechamiento de material rico en almidón, entre otros se han hecho estudios con almidón de maíz y almidón de yuca.

El almidón de yuca se ha aprovechado en la producción de ácido láctico en diversos estudios. Antes de la fermentación es necesario someterlo a un proceso de hidrólisis enzimática, pues posee un porcentaje de aproximadamente 80% en amilopeptina. Una vez hidrolizado posee un alto potencial para ser utilizado como fuente de carbono, aunque la productividad del ácido final es menor que con otros azúcares refinados como la glucosa. Una posible causa es la menor cantidad de azúcar reductor disponible en el almidón de yuca hidrolizado (36).

La melaza de caña es un subproducto de la industria azucarera. Está formada por agua, hidratos de carbono, metales pesados, coloides, vitaminas y compuestos nitrogenados (6).

Lactosa: valorización de suero lácteo

El lactosuero o suero lácteo es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación del coágulo o fase miscelar. Se caracteriza por ser un líquido de color amarillo verdoso, turbio, de sabor débilmente dulce y de carácter ácido. Es un subproducto de la industria de fabricación de queso, y se trata de un potencial contaminante debido a la elevada demanda biológica de oxígeno (DBO) que presenta (37,38).

Posee una interesante composición, conservando más del 50% de los sólidos de la leche, de los que el 8-10% son proteínas y en torno al 70-80% lactosa, lo que hace atractiva su utilización como materia prima para la producción de bioproductos tanto alimenticios como químicos y energéticos. Algunos ejemplos son los concentrados de proteínas de suero, emulsificantes, estabilizantes y otros aditivos que confieren propiedades reológicas y sensoriales en la industria alimentaria (37,38).

En el presente trabajo se han realizado ensayos empleando como fuente de carbono suero lácteo.

Glicerina: valorización de efluentes de la producción de biodiesel

La preocupación por el medio ambiente y la sostenibilidad han dado lugar a la consideración del biodiesel como una alternativa de combustible, pues es biodegradable y desde el punto de vista de inflamabilidad y toxicidad resulta más seguro que el aceite combustible para motores proveniente del petróleo (39).

El proceso comercial más utilizado actualmente para la producción de biodiesel es el basado en la transtesterificación de aceites mediante catálisis homogénea. En el proceso se genera como subproducto el glicerol, en una proporción 10% (w/w). En las fases iniciales de producción de biodiesel, la obtención de glicerol era considerada como algo positivo, pues su venta aumentaba la competitividad del proceso. Con la producción de biodiesel en rampa, el glicerol pasó a estar muy presente en el mercado, lo que causó un colapso en el valor de glicerol bruto, que ha dado lugar a un desplome de 10 veces en los últimos años y ha provocado el cierre de plantas productoras. El glicerol producido en la fabricación de biodiesel ha pasado de ser un preciado producto a un problema de eliminación de residuos (39).

Por todo esto resulta muy interesante su aprovechamiento como fuente de carbono en fermentación, dando lugar a una muy buena producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*, con altos rendimientos y pocos subproductos (6).

Dióxido de carbono: valorización de emisiones contaminantes

El dióxido de carbono se produce durante procesos industriales como la combustión de combustibles fósiles (carbón, gas y petróleo). El desarrollo industrial ha dado lugar a un aumento en la emisión de este gas a la atmósfera, agravando el conocido como “efecto invernadero” que provoca cambio climático. Este gas puede ser utilizado en procesos de fermentación, como los llevados a cabo por *Actinobacillus succinogenes*, que lo utiliza como fuente de carbono y permite la ruta metabólica que da lugar al ácido succínico. Resulta interesante por tanto el posible aprovechamiento de corrientes residuales gaseosas para la producción de ácidos orgánicos de alto valor añadido, como el ácido succínico y el ácido láctico.

Objetivo



El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado se enmarca en la valorización de subproductos/residuos industriales mediante su biotransformación en ácidos orgánicos de alto valor añadido, como ácido succínico y ácido láctico, utilizando el microorganismo *Actinobacillus succinogenes*.

Este objetivo general se lleva a cabo mediante los siguientes objetivos parciales:

- Establecer la viabilidad del proceso de fermentación con medios modelo utilizando sustratos que están presentes en medios naturales: glucosa, lactosa y glicerol; en medios modelo alternativos: manitol; y en medios naturales que son subproductos industriales: suero lácteo.
- Analizar diferentes condiciones de cultivo: fase aerobia, fase anaerobia, fase anaerobia con flujo de dióxido de carbono, y doble fase (periodo aerobio + anaerobio con dióxido de carbono). Se estudia la influencia de las condiciones de cultivo en la producción, productividad, rendimientos y velocidad específica de crecimiento
- Analizar para cada cultivo establecido, la influencia de variables de operación: concentración de carbonato sódico, concentración de hidrógeno carbonato sódico, concentración de magnesio, concentración de calcio, presencia de medio buffer de distintas clases y tipo de sustrato. Se estudia la influencia de éstas variables en la producción, productividad, rendimientos y velocidad específica de crecimiento.
- Analizar la influencia de las condiciones de cultivo en la morfología del microorganismo
- Operación a mayor escala con medio modelo utilizando lactosa como sustrato



Materiales y métodos

1. Condiciones de mantenimiento y crecimiento del microorganismo

1.1. Microorganismo

El microorganismo utilizado fue *Actinobacillus Succinogenes*, suministrado por Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, cuyas características se indican en la Tabla 4.

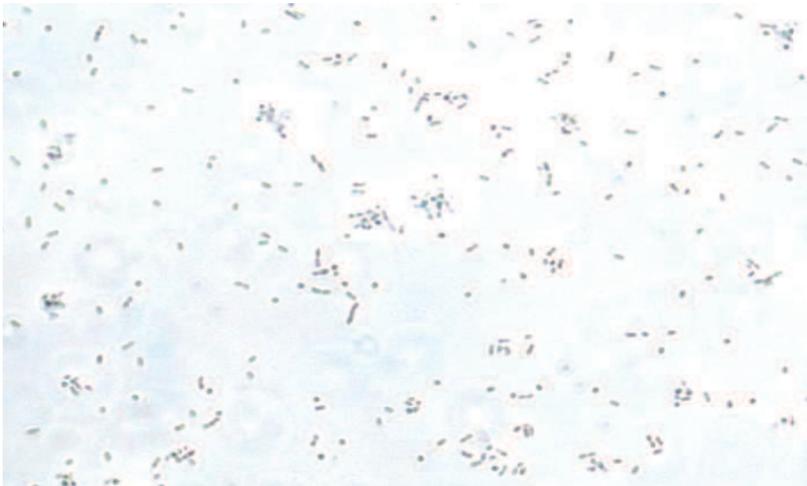


Figura 12. Morfología de *Actinobacillus succinogenes* en condiciones anaeróbicas.

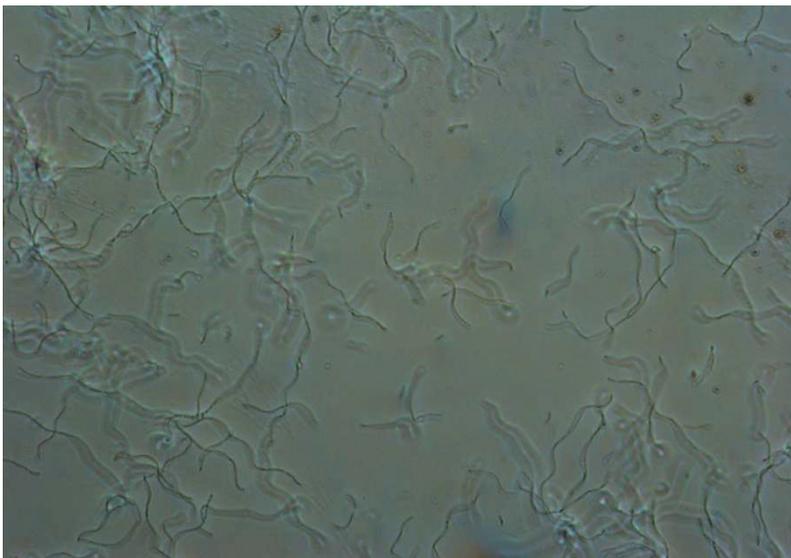


Figura 13. Morfología de *Actinobacillus succinogenes* en condiciones aeróbicas.

Nombre	<i>Actinobacillus succinogenes</i>
DSM n°:	22257, tipo de cepa
Designación de la cepa:	130Z
Otra colección:	ATCC 55618, CCUG 43843, CIP 106512
Aislado de:	Rumen del ganado
Historia:	<-CCUG<-C. Bizet, CIP<-ATCC<-?
Números de acceso Genbank:	16S rRNA gene: AF024525
Condiciones de cultivo:	Medio 215, 37°C 0 Medio 693, 37°C Tiempo de incubación: 1-2 días
Grupo de riesgo:	1 (clasificación de acuerdo a German TRBA)
Regnum:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Proteobacteria</i>
Classis:	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordo:	<i>Pasteurellales</i>
Familia:	<i>Pasteurellales</i>
Genus:	<i>Actinobacillus</i>

Tabla 7. Características de *Actinobacillus Succinogenes* (40).

1.2. Mantenimiento

El microorganismo se encontraba en forma liofilizada contenido en una ampolla. Ésta debe conservarse protegida de la luz solar y a temperatura constante entre 4°C y 24°C. Es viable durante aproximadamente un año desde su adquisición.

La apertura de la ampolla se lleva a cabo el calentamiento de la punta con llama durante unos segundos. Tras ello se adicionan unas gotas de agua, lo que provoca la rotura de la punta por contraste térmico. Se procede entonces a retirar el algodón protector y a la rehidratación con adición de 5 mL de medio de mantenimiento, todo ello con un flujo constante de nitrógeno que garantice las condiciones anaerobias. Una vez homogeneizado medio y microorganismo, se trasfiere la totalidad del contenido de la ampolla a un tubo Hungate (18 x 150 mm) con entre 5 y 10 mL de medio de mantenimiento. Ésta es la llamada cepa original, a partir de la cual se

obtendrán otras por multiplicación de los microorganismos. La cepa se conserva a -30°C .

En los últimos experimentos se empleó una nueva cepa que fue suministrada en un tubo de ensayo con sustrato sólido. Se operó también con un flujo constante de nitrógeno que garantiza las condiciones anaerobias, y con ayuda de un asa de siembra adecuadamente esterilizada para rascar la parte superficial del sustrato, que es donde crece el microorganismo. El material se introduce en un penicilin flask que será incubado en las condiciones 37°C y 100 rpm durante 48 horas. Tras ello el medio que contiene el microorganismo se distribuye en tubos Hungate y se conserva a -30°C .

El medio de mantenimiento (Medio 215) está formado por 5386 Brain Heart Broth (marca Fluka, suministrador Sigma-Aldrich). Este medio se preparó disolviendo 37 g del compuesto en 1 litro de agua destilada. Para su utilización se emplearon tubos Hungate, con 13 mL del medio cada uno, a los que se les proporcionó atmósfera anaerobia con ayuda de agujas hipodérmicas mediante burbujeo con nitrógeno. Posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, y una vez que contienen microorganismo, son conservados a -30°C .



Figura 14. Tubo Hungate con microorganismo en el medio de mantenimiento (izquierda), tubo Hungate con medio de mantenimiento (derecha).

Las operaciones de trasvase de microorganismo se llevaron a cabo en cámara de flujo laminar (FOSTER WHEELER, STERIL, BioBan 48).

1.3. Medio de crecimiento y condiciones de cultivo

Tanto para los precultivos como para los cultivos en el biorreactor se preparó el medio descrito en (37), que contiene por cada 1000 mL:

- 30-40 g sustrato
- 5 g extracto de levadura
- 10 g peptona
- 3 g K_2HPO_4
- 1 g NaCl
- 0.02 g $CaCl_2 \cdot H_2O$
- 0.02 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

Sustrato de tipo carbohidrato

Han sido llevado a cabo ensayos empleando como sustrato glucosa, lactosa, mezcla de glucosa y lactosa, y glicerol.

Sustrato de tipo polialcohol

Han sido llevados a cabo ensayos empleando como sustrato glicerol y manitol.

Sustrato proveniente de materias primas naturales

Como sustrato natural se ha empleado suero lácteo de oveja y cabra. Los análisis por HPLC indican un contenido en lactosa de 100 g/L, por lo que se procedía a su dilución en los casos en los que la concentración deseada fuera otra.

Disolución de medio buffer

Con objeto de mantener el pH en el valor deseado durante la fermentación, en algunos experimentos se adicionó disolución de medio buffer. Se ha trabajado con medio buffer de cacodilato sódico (41) y de fosfato (42).

Los precultivos se prepararon en penicilin flasks de 100 mL, cerrados con septums de goma que permiten la adición o sustracción de disolución y gases a través de jeringa. Cuando se empleó sustrato de tipo carbohidrato o de tipo polialcohol, en cada frasco se vertieron 45 mL de medio de crecimiento, mientras que cuando se empleó suero lácteo, se vertieron 22,5 mL de medio de crecimiento sin sustrato, adicionándose después 22,5 mL de suero. Al igual que en los tubos Hungate, de operarse en condiciones anaerobias se recurre a agujas hipodérmicas con las que se burbujea nitrógeno durante diez

minutos, colocando una de ellas en contacto con el medio y otra en contacto con la fase gas del recipiente, a modo de conducto de salida. Con ambas agujas se proporciona también atmósfera anaerobia a los recipientes. De esta manera reemplazamos el oxígeno existente por nitrógeno. Se crea presión (inferior a 0,7 bar para evitar riesgo de rotura en la esterilización) dejando la aguja de entrada dos segundos tras la retirada de la aguja de salida. Una vez acondicionados, los penicilin flasks se esterilizan en autoclave (J.P. SELECTA, AUTESTER) a 121°C durante 20 min. A los experimentos en condiciones anaerobias, antes de la inoculación de la cepa, se les burbujea dióxido de carbono a través de filtro siguiendo el mismo procedimiento que se siguió con el nitrógeno. De operar en condiciones aerobias no es necesario.

A la disolución de suero lácteo cuando es necesario se le proporciona también atmósfera anaerobia, y se procede a su esterilización por separado, a 121°C y durante 10 min. Seguidamente se vierten 22,5 mL de ella en los penicilin flasks destinados a sustrato natural, conteniendo así un total de 45 mL de medio. El suero se añade al medio utilizando filtros estériles (Ministart SARTORIUS, 0,20 µm Sterile Filtres).



Figura 15. Penicilin flasks con medio de crecimiento burbujeado con nitrógeno.



Figura 16. Suero lácteo esterilizado.

En la Figura 15 se muestra como tras la esterilización del suero lácteo se produce la desnaturalización de las proteínas y su precipitación. Los análisis HPLC del sobrenadante mostraron que el contenido de lactosa no se veía modificado de forma significativa por ello.

En cada uno de los penicilin flasks se inocularon 5 mL de cepa, de manera que el porcentaje de inóculo fuera 10% (v/v) con objeto de reducir la duración de la fase de latencia. Algunos precultivos se utilizaron como inóculo para el biorreactor, manteniéndose en estufa de cultivo durante 1-2 días, a 37°C y sin agitación. Otros precultivos se mantuvieron en incubador orbital durante varios días llevando a cabo un seguimiento del proceso de fermentación que en ellos tenía lugar.

2. Experimentos en penicilin flasks



Figura 17. Incubador orbital agitado (COMECTA).

Tras el período de incubación se procedió a la inoculación de los penicilin flasks, formando un volumen total de 50 mL (10% v/v). Como ya se ha dicho, son previamente esterilizados en autoclave. El proceso de fermentación tuvo lugar en incubador orbital agitado (COMECTA), provisto de control de temperatura y agitación automático (Figura 17). Las condiciones de cultivo fueron de 37°C y 200 rpm. En este caso, el pH no fue controlado con la adición de ninguna disolución ácida o básica, pero sí se mantuvo aproximadamente constante en aquellos experimentos en los que se utilizó medio buffer. Cuando se requiere flujo de dióxido de carbono, éste es suministrado por medio de dos agujas hipodérmicas, una a modo de entrada y en contacto con el medio, y otra a modo de salida y en contacto con la fase gas del interior. En la Figura 17 se muestran seis penicilin flasks con flujo de dióxido de carbono y otros seis sin él. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Cada día se tomó 1,5 mL de muestra del medio, en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar. Las muestras fueron conservadas en eppendorfs a -30°C hasta su análisis.



Figura 18. Fermentación en penicilin flasks en el incubador orbital agitado, con flujo de dióxido de carbono.

3. Experimentos en biorreactor

Los experimentos fueron realizados en biorreactores Biosat Bplus de 2 L de volumen útil. Son suministrados por la casa comercial SARTORIUS.

El equipo cuenta con una serie de puertos que permiten la inserción de sondas de nivel, de pH (HAMILTON, Easyferm plus k8 200), de temperatura, de oxígeno (HAMILTON, OXYFERM FDA 225), una toma de muestras, un cooler o condensador, una inyección de gases y un tapón con orificios para la adición de ácido, base y antiespumante. A la tapa va acoplado un agitador de turbina de disco y un difusor para la dispersión de gases. La temperatura se mantiene gracias a un encamisado. El control de parámetros, la calibración y otras tareas se realizan a través de un panel táctil.

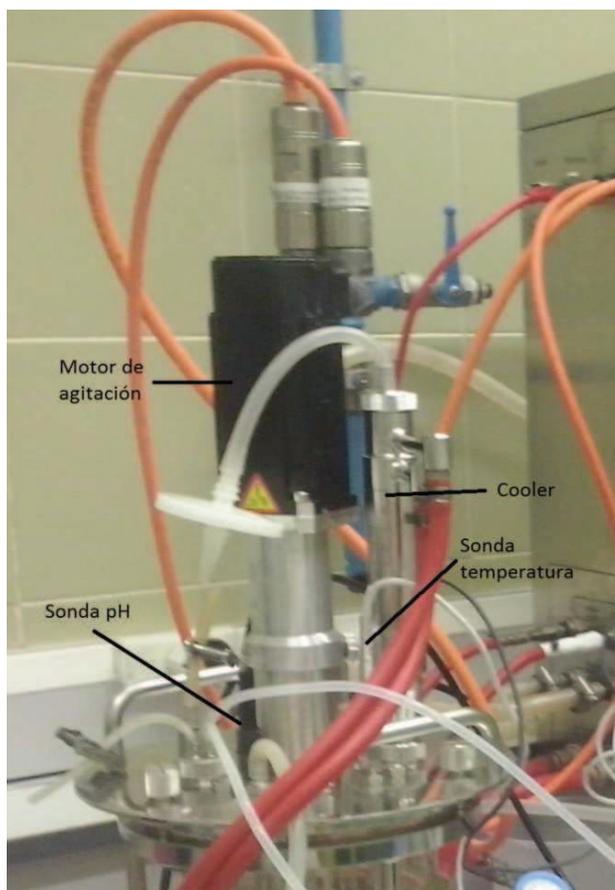


Figura 19. Detalle biorreactor Biosat Bplus 2L.

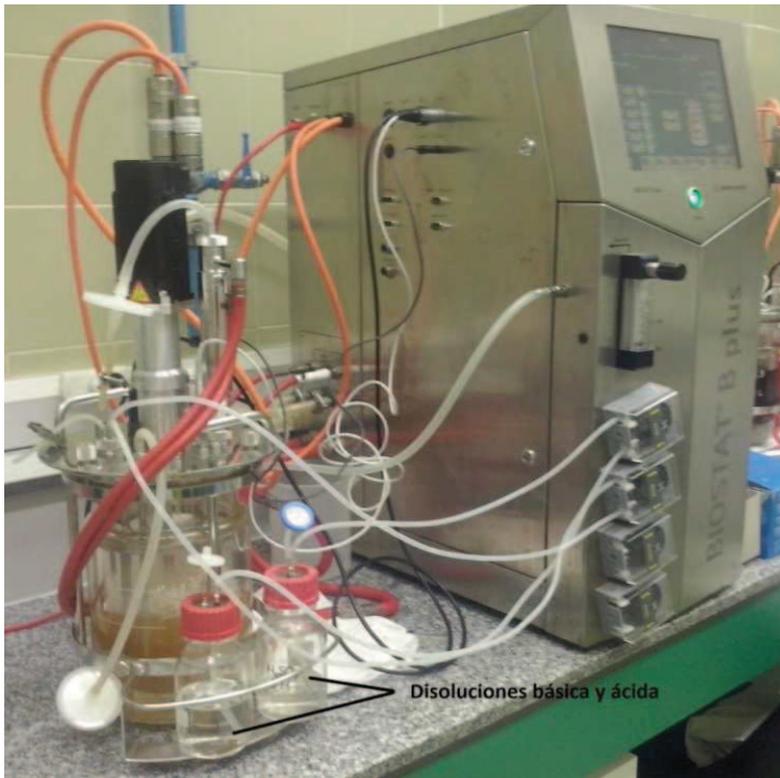


Figura 20. Biorreactor Biosat Bplus 2L.

Se añaden 900 mL de medio de crecimiento y 100 mL de inóculo (precultivo).

Las condiciones son las indicadas en la literatura (37): agitación 200 rpm, temperatura 37°C, pH 6,7 y 0,5 L/min de dióxido de carbono. Para el control del pH se utiliza 1,5 N H₂SO₄ y 3 N NaOH.

El reactor se esteriliza en autoclave, cerrado y con el medio en su interior. Tras ello y cuando aún está caliente, en los ensayos que operan en anaerobio se procede a burbujear nitrógeno desplazando así el oxígeno. En ciertos ensayos se burbujea a continuación dióxido de carbono. De operar en condiciones aerobias tiene lugar el burbujeo de aire ambiente, que se hace pasar a través de filtro estéril. Mientras se burbujea se abren los conductos de salida para que la atmósfera se reemplace.

Por el conducto “toma-muestra” se sustraen 1,5 mL del medio cada ciertas horas. Las muestras se toman hasta que la medida de biomasa comienza a decaer o hasta que ya no se consume base (el pH ha dejado de disminuir porque no se están produciendo ácidos). Son conservadas en eppendorfs a -30°C hasta su análisis.

4. Métodos analíticos

4.1. Determinación del sustrato, producto y subproductos

Los compuestos presentes en el caldo de fermentación fueron analizados mediante técnica HPLC, usando una columna Aminex Biorad HPX87H (300 mm x 7.8 mm) a 60°C, además de un Detector de Índice de Refracción (refractómetro diferencial 410 de Waters). El eluyente utilizado fue ácido sulfúrico 0,01 N con flujo 0,6 mL/min.

La preparación de las muestras de fermentación consistió en una centrifugación inicial (EPPENDORF, MiniSpin) durante 10 minutos a 5000 revoluciones por minuto. A continuación las muestras se diluyeron 1:10 con agua MilliQ con objeto de trabajar en el rango de análisis (3-6 g/L). Por último se procedió al filtrado de la disolución a través de filtros de nylon (SARTORIUS, 0,20 µm).

En estas condiciones, los tiempos de residencia de los compuestos analizados son los siguientes:

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Lactosa	8,20
Glucosa	9,75
Galactosa	10,40
Ácido succínico	12,60
Ácido láctico	13,70
Ácido fórmico	14,90
Ácido acético	16,20
Etanol	23,40
Glicerol	13,60
Manitol	10,26

Tabla 8. Tiempos de retención de sustrato, producto y subproductos.

4.2. Medida de biomasa

La concentración de biomasa fue determinada con ayuda de los métodos de densidad óptica y masa seca.

4.2.1. Densidad óptica

El crecimiento de biomasa se siguió mediante medidas periódicas de la densidad óptica (OD) en un espectrofotómetro HITACHI U200 UV/Visible (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan), operando con una longitud de onda de 600 nm. Las medidas de OD se llevaron a cabo inmediatamente después de tomarse muestra. Si alguna muestra presentaba una medida superior a 1, era diluida 1:10 con agua MilliQ.

4.2.2. Masa seca

Para el cálculo del calibrado que relaciona la densidad óptica con la masa seca de microorganismo se siguieron una serie de pasos. En primer lugar se determinó la masa de un filtro de membrana de nylon, con tamaño de poro 0.20 μm , totalmente libre de humedad. A continuación se tomó muestra del caldo final de fermentación y se hizo pasar por el filtro. Una vez eliminada la humedad de este, se determinó de nuevo la masa. Con la diferencia en la medida y el volumen de muestra se calcula la biomasa seca para la muestra final del caldo de fermentación. A partir de esta muestra se prepararon patrones por dilución. Se midió la densidad óptica de cada uno de los patrones, que fue relacionada con la biomasa seca. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

	Concentración células (masa seca) (g/L)	Densidad óptica
Muestra 1 (1:1)	1,417 \pm 0,001	0,365
Muestra 2 (1:2)	0,709 \pm 0,001	0,195
Muestra 3 (1:4)	0,354 \pm 0,001	0,105
Muestra 4 (1:8)	0,191 \pm 0,001	0,063
Muestra 0	0 \pm 0,001	0,000

Tabla 9. Datos del calibrado de la biomasa en función de la absorbancia.

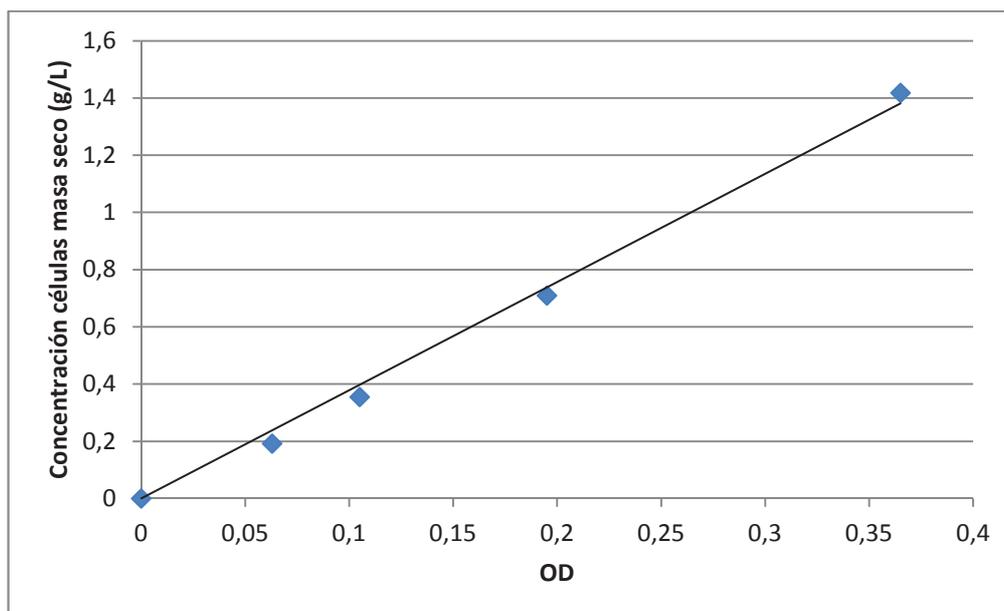


Figura 21. Concentración de biomasa en g/L por absorbancia a 600 nm.

$$Biomasa \left(\frac{g}{L} \right) = 3.7835 \cdot OD$$

$$R^2 = 0.995$$

4.3. Observación microscópica de cultivos

Las imágenes de la morfología del microorganismo cultivado fueron tomadas en microscopio (LEICA DM 400B) con lámpara halógena y de mercurio, provisto de cuatro lentes (5x, 10x, 20x y 100x). Para la obtención de fotografías se empleó una cámara (LEICA) acoplada al microscopio y software para el análisis de las imágenes (LEICA APPLICATION SUITE),



Análisis de resultados

1. Ensayos en penicilin flasks

1.1. Ensayos con glucosa

1.1.1. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico

Se comparan dos ensayos llevados a cabo en condiciones aerobias y sin adición de Na_2CO_3 . Uno de los ensayos se desarrolló sin adición de medio buffer (Ensayo 1.1.1.) y otro con adición de medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.1.2.). Los resultados se muestran en la Figura 22 y en la Tabla 10.

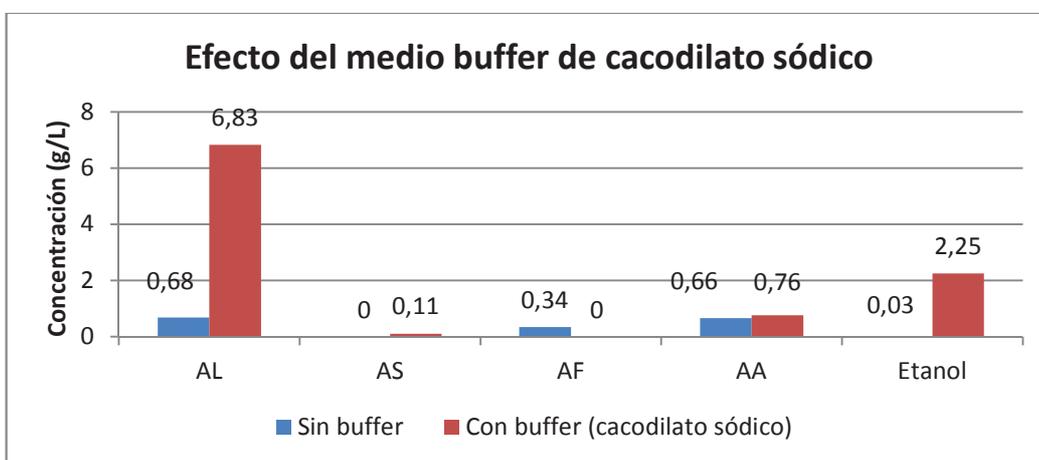


Figura 22. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico en ensayos con glucosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.1 y 1.1.2.).

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	$Y_{AL/S}$ (g/g)	$Y_{AS/S}$ (g/g)	$Y_{AF/S}$ (g/g)	$Y_{AA/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)
1.1.1.	0,680	0,007	0,105	0,000	0,053	0,102	0,005
1.1.2.	6,830	0,041	0,768	0,012	0,000	0,085	0,253

Tabla 10. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.1. y del Ensayo 1.1.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.



Las condiciones aerobias dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido láctico.

La adición de medio buffer da lugar a una producción mucho mayor de ácido láctico, bastante mayor de etanol, algo mayor de ácido succínico y ácido acético, e inferior de ácido fórmico. El aumento mayor en el etanol es debido a que este compuesto se produce en las etapas tardías de la fermentación; de no regularse el pH los microorganismos no estarán en condiciones de producir etanol en estas etapas.

Sin adición de medio buffer la concentración de los compuestos es muy baja, pues el ácido láctico hace que baje mucho el pH dando lugar a problemas en el proceso de fermentación. El orden de acidez de los compuestos es el siguiente (43):

Ácido láctico ($pK_a=3,5$) > Ácido fórmico ($pK_a=3,74$) > Ácido succínico ($pK_{a1}=4,2$ y $pK_{a2}=5,6$) > Ácido acético ($pK_a=4,76$) > Etanol ($pK_a=15,9$)

Se concluye que en la fermentación cuyo producto mayoritario es ácido láctico, es muy importante controlar el pH para obtener una elevada concentración.

1.1.2. Efecto del Na₂CO₃

Se comparan dos ensayos llevados a cabo en condiciones aerobias y con adición de medio buffer de cacodilato sódico. A uno de ellos no se le adicionó Na₂CO₃ (Ensayo 1.1.2.) y a otro sí (Ensayo 1.1.3.), en concentración 2 g/L. Los resultados se muestran en la Figura 23 y en la Tabla 11.

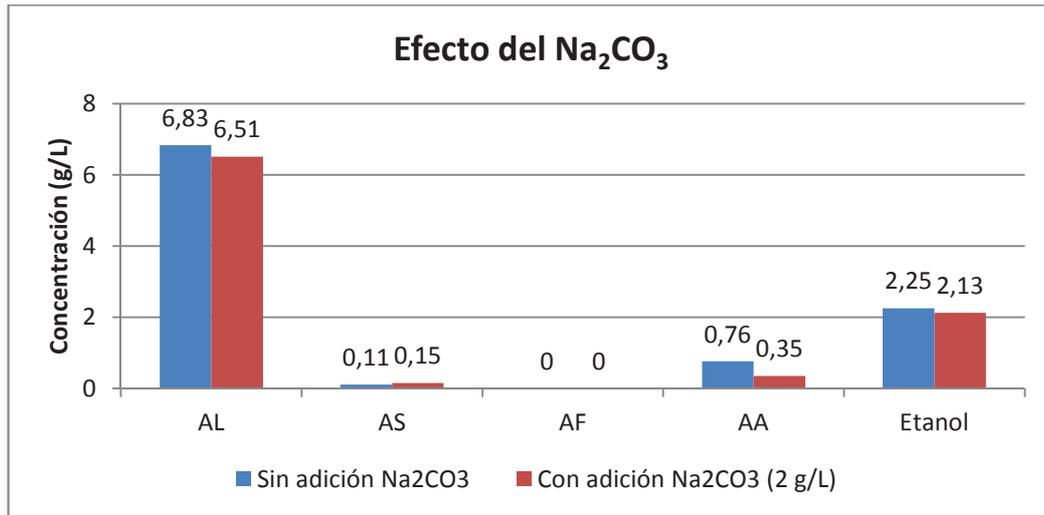


Figura 23. Efecto del Na₂CO₃ en ensayos con glucosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.2. y 1.1.3.).

Ensayo	P	Prod.	Y _{AL/S}	Y _{AS/S}	Y _{AF/S}	Y _{AA/S}	Y _{E/S}
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.1.2.	6,830	0,041	0,768	0,012	0,000	0,085	0,253
1.1.3.	6,510	0,039	0,741	0,017	0,000	0,040	0,242

Tabla 11. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.2 y del Ensayo 1.1.3. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones aerobias dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido láctico.

La adición de Na_2CO_3 disminuye ligeramente la concentración final de ácido láctico, ácido acético y etanol. Sin embargo, aumenta ligeramente la de ácido succínico.

Como puede comprobarse en el Anexo I, el Na_2CO_3 actúa como una fuente de carbono reduciendo el consumo de sustrato.

La disminución global de subproductos es mayor que la de los productos de interés, por lo que se considera interesante el uso de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L pues aumenta el rendimiento. Sin embargo, su adición no da lugar a un aumento en la concentración de ácido láctico pues el aporte de CO_2 en forma de carbonato favorece la ruta de obtención de ácido succínico, sobre todo en mayores concentraciones. En la bibliografía (32) se muestra como en la obtención de ácido láctico no se requiere necesariamente la presencia de Na_2CO_3 .

1.1.3. Efecto del doble período de fermentación

Se comparan dos ensayos llevado a cabo con adición de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L y con adición de medio buffer de cacodilato sódico. Uno de ellos tiene lugar en condiciones aerobias (Ensayo 1.1.3.) y otro con doble período (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO_2) (Ensayo 1.1.4.). Los resultados se muestran en la Figura 24 y en la Tabla 12.

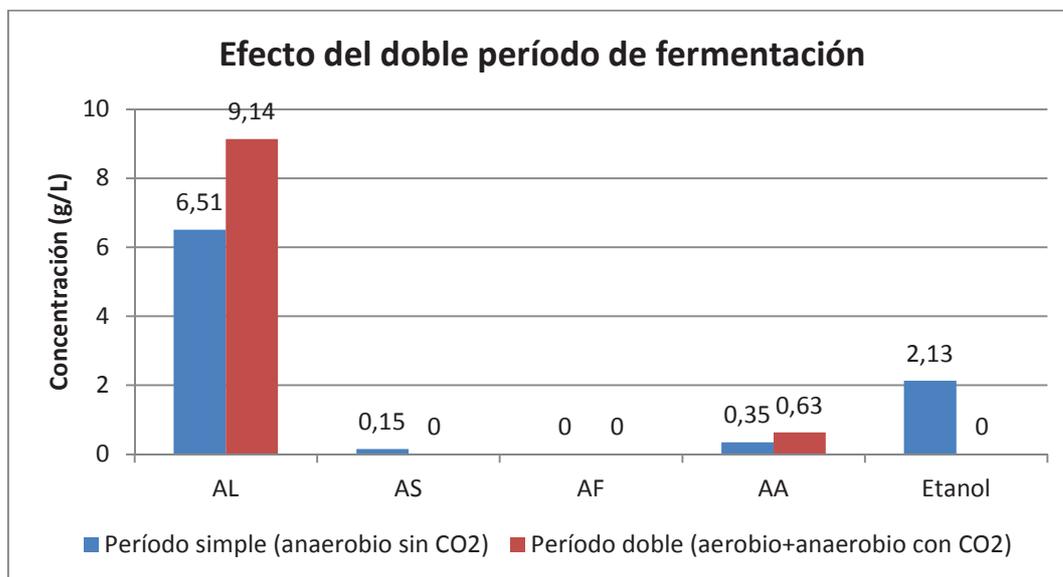


Figura 24. Efecto del doble período de fermentación en ensayos con glucosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.3. y 1.1.4.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	$Y_{AL/S}$ (g/g)	$Y_{AS/S}$ (g/g)	$Y_{AF/S}$ (g/g)	$Y_{AA/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)
1.1.3.	6,510	0,039	0,741	0,017	0,000	0,040	0,242
1.1.4.	9,140	0,056	0,625	0,000	0,000	0,043	0,000

Tabla 12. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.3. y del Ensayo 1.1.4. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación con doble período da lugar a un aumento considerable en la concentración de ácido láctico, como también muestra la bibliografía (32).

Aumenta también ligeramente la concentración de ácido acético, lo cual es lógico debido a que es el compuesto que habitualmente acompaña al ácido láctico en las fermentaciones lácticas (Figura 9)

El hecho de que parte del período sea en aerobio reduce la concentración de ácido succínico a cero.

El doble período es por tanto un buen método de operación para la obtención mayoritaria de ácido láctico.

1.1.4. Comparación de distintos medios buffer

Se comparan dos ensayos llevados a cabo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio) y con adición de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L. A uno de ellos se le adicionó medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.1.4.) y a otro medio buffer de fosfato (Ensayo 1.1.5.). Los resultados se muestran en la Figura 25 y en la Tabla 13.

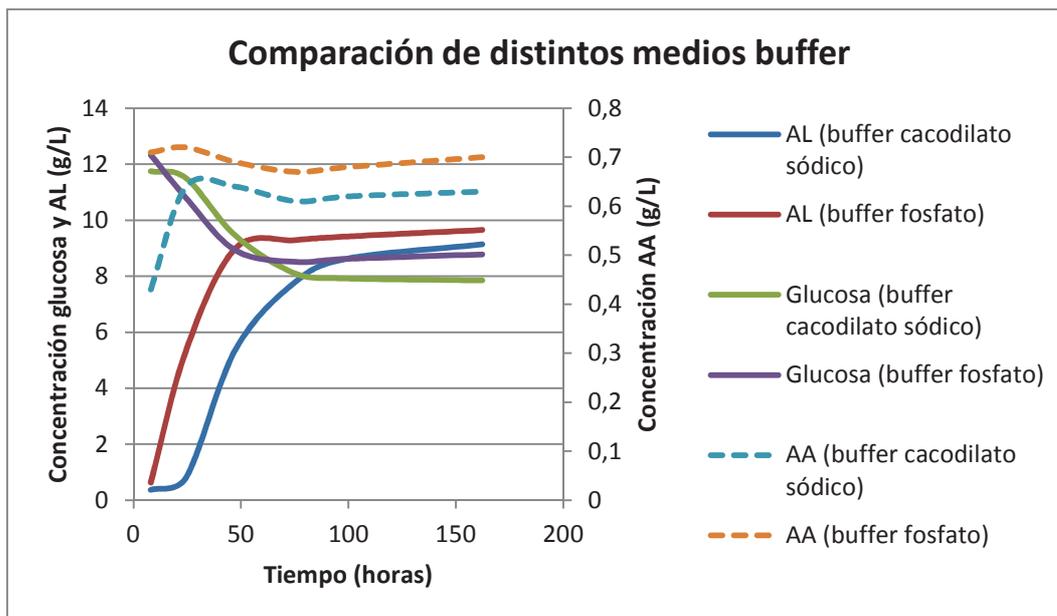


Figura 25. Comparación de distintos medios buffer en ensayos con glucosa. AL, ácido láctico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.4. y 1.1.5.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.1.4.	9,140	0,056	0,625	0,000	0,000	0,043	0,000
1.1.5.	9,650	0,059	0,672	0,000	0,014	0,049	0,000

Tabla 13. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.4. y del Ensayo 1.1.5. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación con doble período da lugar a que el producto mayoritario sea ácido láctico.

La concentración de ácido succínico es mínima, o en este caso nula, gracias al período aerobio.

El medio buffer de fosfato da permite una mayor concentración de ácido láctico y de ácido acético. Además da lugar a un menor consumo de sustrato. En diversa bibliografía (42) se emplea este tipo de medio buffer.

Resulta por tanto beneficioso en cuanto a la producción y al rendimiento el empleo de medio buffer de fosfato.

1.2. Ensayos con lactosa

1.2.1. Efecto del CO₂

Se comparan dos ensayos llevados a cabo sin adición de Na₂CO₃ y sin adición de medio buffer. Ambos operaron en condiciones anaerobias, uno de ellos sin flujo de CO₂ (Ensayo 1.2.1.) y otro con flujo de CO₂ (Ensayo 1.2.2.). Los resultados se muestran en la Figura 26 y en la Tabla 14.

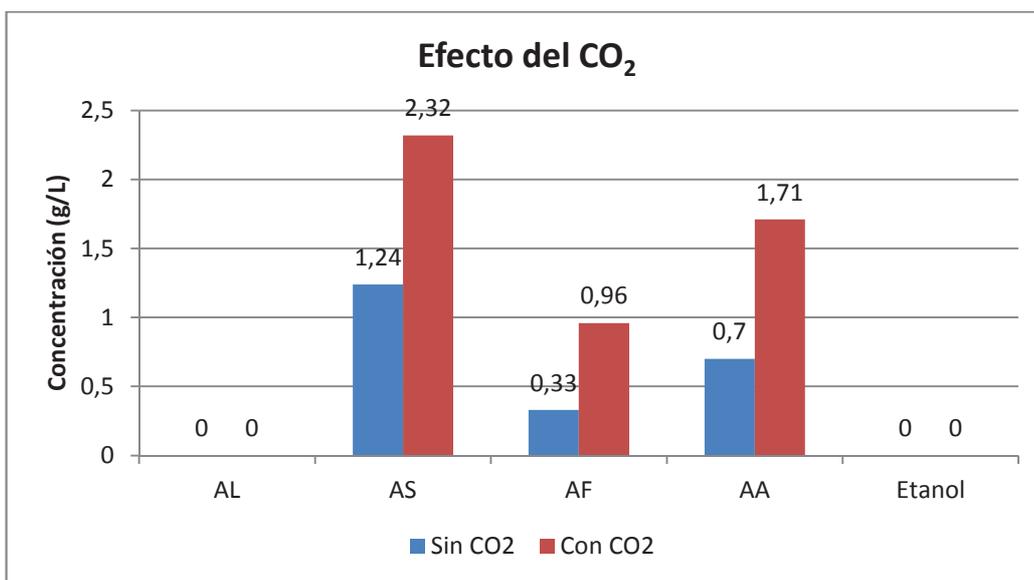


Figura 26. Efecto del CO₂ en ensayos con lactosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.2.1. y 1.2.2.)

Ensayo	P	Prod.	Y _{AL/S}	Y _{AS/S}	Y _{AF/S}	Y _{AA/S}	Y _{E/S}
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.2.1.	1,240	0,010	0,000	0,138	0,037	0,078	0,000
1.2.2.	2,320	0,019	0,000	0,490	0,203	0,362	0,000

Tabla 14. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.4. y del Ensayo 1.1.5. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones anaerobias dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido succínico, como se indica en la bibliografía (37).

El flujo de CO₂ permite una concentración aproximadamente del doble en ácido succínico, ácido fórmico y ácido acético. Otra ventaja del uso de CO₂ es que actúa como fuente de carbono reduciendo el consumo de sustrato, como puede comprobarse en el Anexo I.

Se demuestra cómo la adición de buffer no es tan importante en la obtención de ácido succínico como en la de ácido láctico, pues aquel es menos ácido.

Se concluye que resulta beneficioso el suministro de CO₂ en la obtención de ácido succínico, aumentando la producción y rendimiento.

1.2.2. Efecto del Na₂CO₃

Se comparan dos ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias con flujo de CO₂ y sin adición de medio buffer. A uno de ellos no se le adicionó Na₂CO₃ (Ensayo 1.2.2.) y a otro sí, en concentración 1 g/L (Ensayo 1.2.3.). Los resultados se muestran en la Figura 27 y en la Tabla 15.

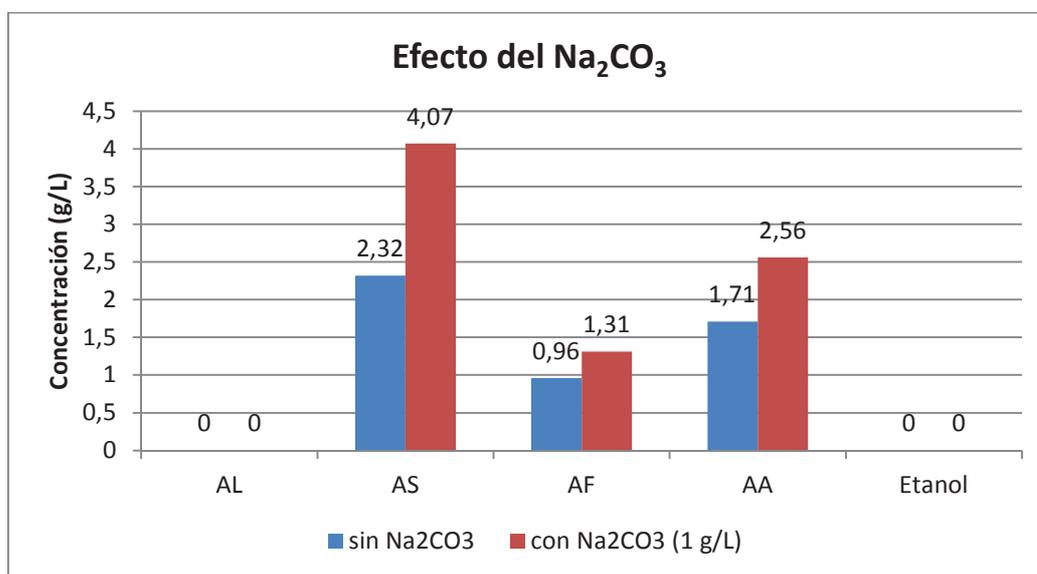


Figura 27. Efecto del Na₂CO₃ en ensayos con lactosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.2.2. y 1.2.3.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.2.2.	2,320	0,019	0,000	0,490	0,203	0,362	0,000
1.2.3.	4,070	0,034	0,000	0,771	0,248	0,485	0,000

Tabla 15. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.2.2. y del Ensayo 1.2.3. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones anaerobias con flujo de CO_2 dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido succínico.

La adición de Na_2CO_3 permite un aumento en la concentración de los ácidos producidos, sobre todo en el ácido succínico. Otra ventaja del Na_2CO_3 es que actúa como fuente de carbono reduciendo el consumo de sustrato (Anexo I).

El uso de Na_2CO_3 da lugar por tanto a una mayor producción y rendimiento de ácido succínico en las condiciones dadas de operación.

1.2.3. Efecto de distintas concentraciones de Na₂CO₃

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias con flujo de CO₂ y sin adición de medio buffer. A un ensayo se le adicionó Na₂CO₃ en concentración 1 g/L (Ensayo 1.2.3.) y a otro en concentración 2 g/L (Ensayo 1.2.4.). Los resultados se muestran en la Figura 28 y en la Tabla 16.

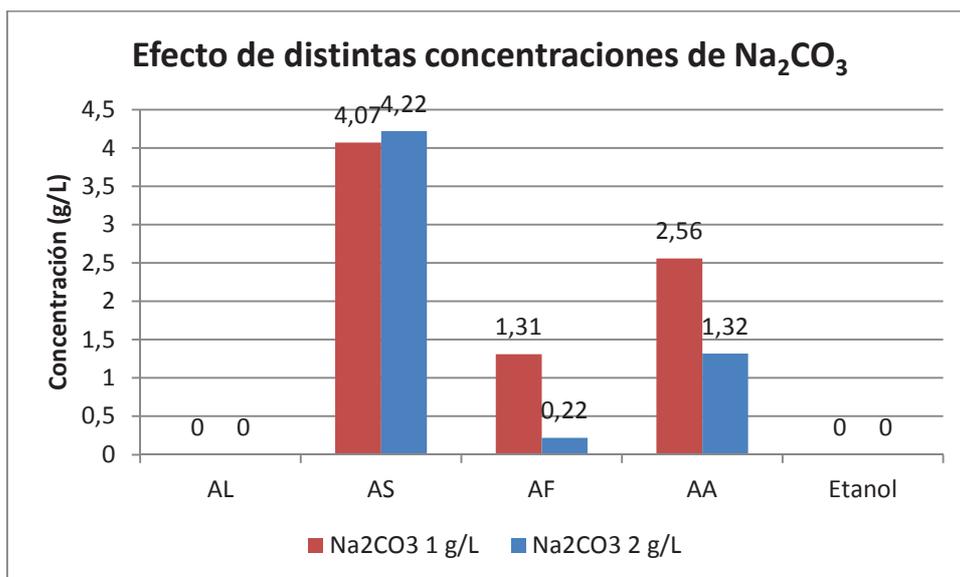


Figura 28. Efecto de distintas concentraciones de Na₂CO₃ en ensayos con lactosa. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.2.3. y 1.2.4.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	Y _{AL/S} (g/g)	Y _{AS/S} (g/g)	Y _{AF/S} (g/g)	Y _{AA/S} (g/g)	Y _{E/S} (g/g)
1.2.3.	4,070	0,034	0,000	0,771	0,248	0,485	0,000
1.2.4.	4,220	0,035	0,000	3,431	0,179	1,073	0,000

Tabla 16. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.2.3. y del Ensayo 1.2.4. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones anaerobias con flujo de CO₂ dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido succínico.

Una mayor concentración de Na₂CO₃ da lugar a una mayor producción de ácido succínico y sobre todo a una menor de subproductos. El consumo de sustrato también es menor en el caso de mayor concentración de Na₂CO₃ por actuar éste como fuente alternativa de carbono (Anexo I). En la bibliografía se compararon distintas concentraciones de carbonato (44).

Resulta por tanto beneficioso la utilización de Na₂CO₃ en concentración 2 g/L frente a en concentración 1 g/L, pues aumenta la producción y el rendimiento del ácido succínico.

1.2.4. Comparación de distintos medios buffer

Se comparan ensayos llevados a cabo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO₂) y con adición de Na₂CO₃ en concentración 2 g/L. A uno de los ensayos se le adicionó medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.2.5.) y a otro medio buffer de fosfato (Ensayo 1.2.6.). Los resultados se muestran en la Figura 29 y en la Tabla 17.

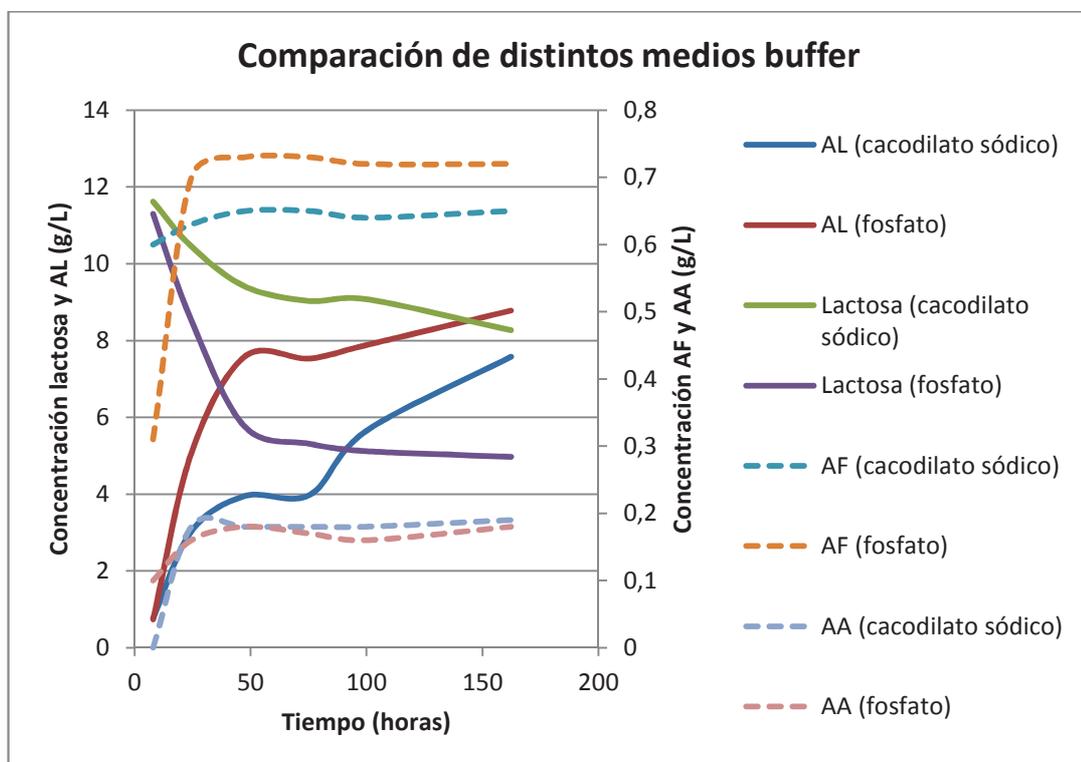


Figura 29. Comparación de distintos medios buffer en ensayos con lactosa. AL, ácido láctico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.2.5. y 1.2.6.).

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.2.5.	7,580	0,047	0,416	0,000	0,036	0,010	0,000
1.2.6.	8,780	0,054	0,406	0,000	0,033	0,008	0,000

Tabla 17. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.5. y del Ensayo 1.1.6. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones aerobias dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido láctico.

El medio buffer de fosfato permite una mayor producción de ácido láctico y de ácido fórmico. La producción de ácido acético pasa a ser algo menor. El consumo de sustrato cuando se emplea medio buffer de fosfato es mayor, pero es lógico porque la producción de ácido láctico ha aumentado considerablemente.

Resulta beneficioso en la producción de ácido láctico el empleo de medio buffer de fosfato frente al de cacodilato sódico, pues aumenta la producción.

1.3. Ensayos con mezcla de glucosa y lactosa (co-fermentación)

1.3.1. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones aerobias y sin adición de Na_2CO_3 . A uno de los ensayos no se le adicionó medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.3.1.) y a otro sí, de cacodilato sódico (Ensayo 1.3.2.). Los resultados se muestran en la Figura 30 y en la Tabla 18.

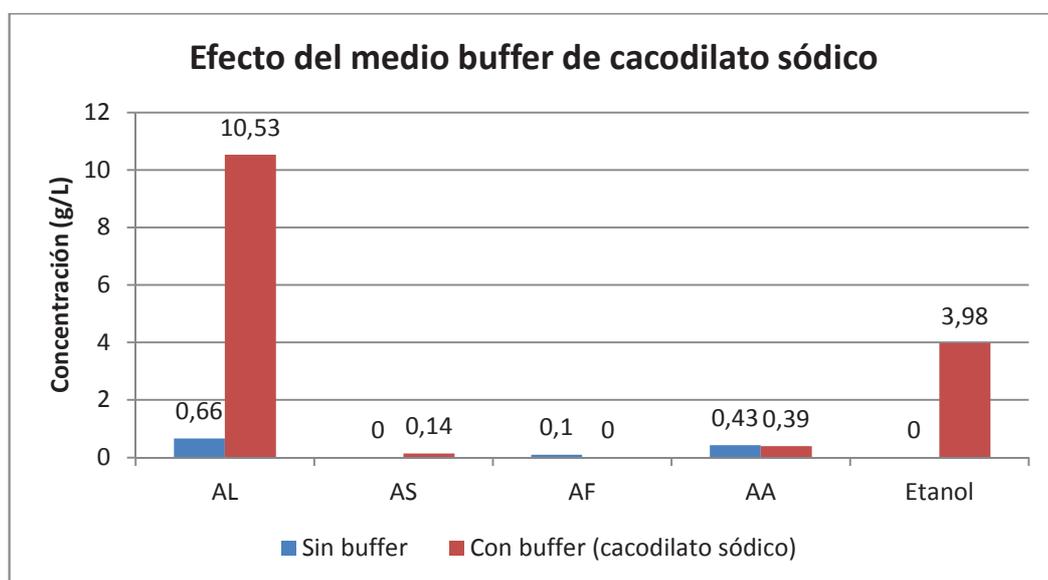


Figura 30. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico en ensayos con mezcla de glucosa y lactosa (co-fermentación). AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.3.1. y 1.3.2.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	$Y_{AL/S}$ (g/g)	$Y_{AS/S}$ (g/g)	$Y_{AF/S}$ (g/g)	$Y_{AA/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)
1.3.1.	0,660	0,007	0,126	0,000	0,019	0,082	0,000
1.3.2.	10,530	0,063	0,818	0,011	0,000	0,030	0,309

Tabla 18. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.3.1. y del Ensayo 1.3.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones aerobias da lugar a que el producto mayoritario sea el ácido láctico.

Regular el pH da lugar a una producción de ácido láctico mucho mayor. También aumenta la producción de etanol, pues este se produce en las etapas tardías de vida del microorganismo, a las que sólo llega si las condiciones del medio son las adecuadas. La producción de ácido succínico aumenta ligeramente con el uso de medio buffer, mientras que las de subproductos disminuyen ligeramente.

Resulta muy beneficioso el uso de medio buffer en la obtención de ácido láctico.

1.3.2. Efecto del Na₂CO₃

Se comparan ensayos llevado a cabo en condiciones aerobias y con adición de medio buffer de cacodilato sódico. A uno de ellos no se le adicionó Na₂CO₃ (Ensayo 1.3.2.) y a otro sí, en concentración 2 g/L (Ensayo 1.3.3.). Los resultados se muestran en la Figura 31 y en la Tabla 19.

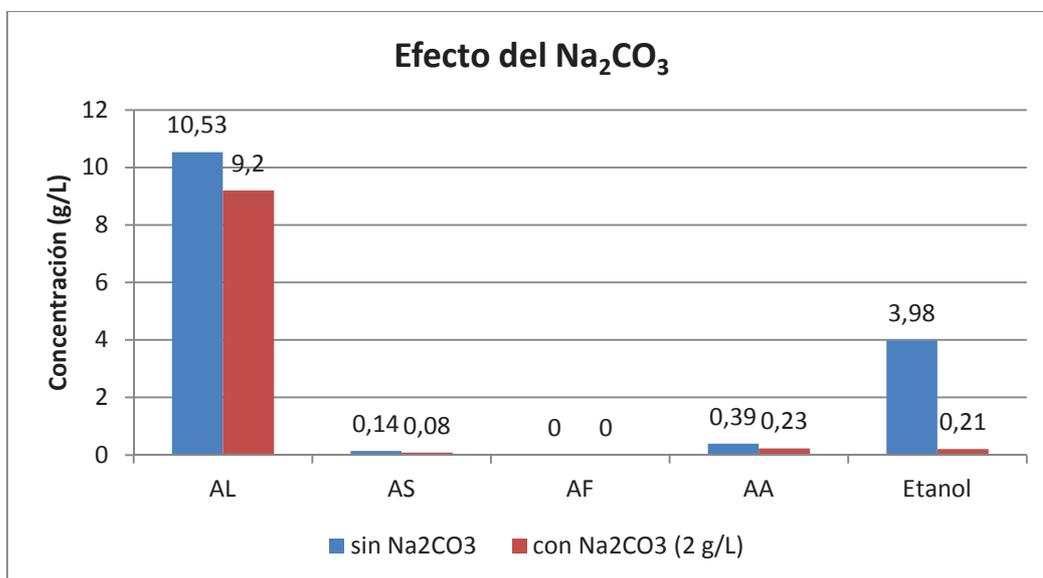


Figura 31. Efecto del Na₂CO₃ en ensayos con mezcla de glucosa y lactosa (co-fermentación). AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.3.2. y 1.3.3.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.3.2.	10,530	0,063	0,818	0,011	0,000	0,030	0,309
1.3.3.	9,200	0,055	0,855	0,007	0,000	0,021	0,020

Tabla 19. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.3.2. y del Ensayo 1.3.3. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones aerobias da lugar a que el ácido láctico sea el producto mayoritario.

La adición de Na_2CO_3 disminuye ligeramente la producción de todos los compuestos, sobre todo la de etanol. También tiene lugar un menor consumo de sustrato (Anexo I).

La adición de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L aumenta el rendimiento en la obtención de ácido láctico por actuar como fuente alternativa de carbono, pero no aumenta la producción.

1.4. Ensayos con glicerol

1.4.1. Comparación de distintos medios buffer

Se comparan ensayos llevados a cabo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO₂) y con adición de Na₂CO₃ en concentración 2 g/L. A uno de los ensayos se adicionó medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.4.1.) y a otro medio buffer de fosfato (Ensayo 1.4.2.). Los resultados se muestran en la Figura 32 y en la Tabla 20.

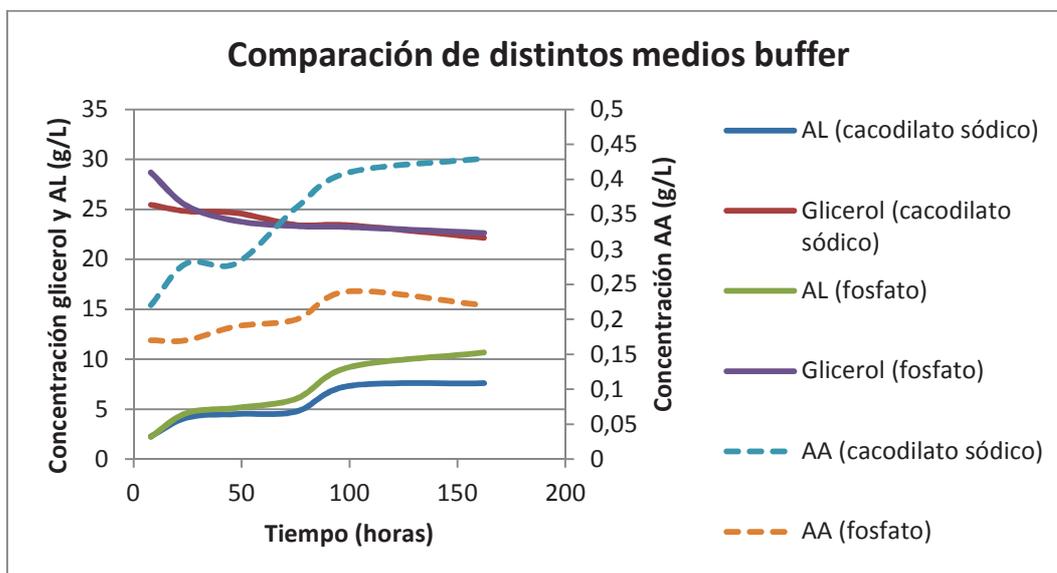


Figura 32. Comparación de distintos medios buffer en ensayos con glicerol. AL, ácido láctico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.4.1. y 1.4.2.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	Y _{AL/S} (g/g)	Y _{AS/S} (g/g)	Y _{AF/S} (g/g)	Y _{AA/S} (g/g)	Y _{E/S} (g/g)
1.4.1.	7,600	0,047	0,969	0,000	0,000	0,055	0,000
1.4.2.	10,670	0,066	1,450	0,019	0,000	0,030	0,000

Tabla 20. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.4.1. y del Ensayo 1.4.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

El doble período de fermentación da lugar a que el ácido láctico sea el producto mayoritario.

El ensayo con medio buffer de fosfato da lugar a una mayor concentración de ácido láctico y a una menor de subproductos (ácido acético). El consumo de sustrato es aproximadamente igual en ambos ensayos.

En consecuencia resulta beneficioso utilizar este medio buffer en la obtención de ácido láctico, pues aumenta producción y rendimiento.

1.5. Ensayos con manitol

1.5.1. Comparación de distintos medios buffer

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 y con adición de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L. A uno de los ensayos se adicionó medio buffer de cacodilato sódico (Ensayo 1.5.1.) y a otro medio buffer de fosfato (Ensayo 1.5.2.). Los resultados se muestran en la Figura 33 y en la Tabla 21.

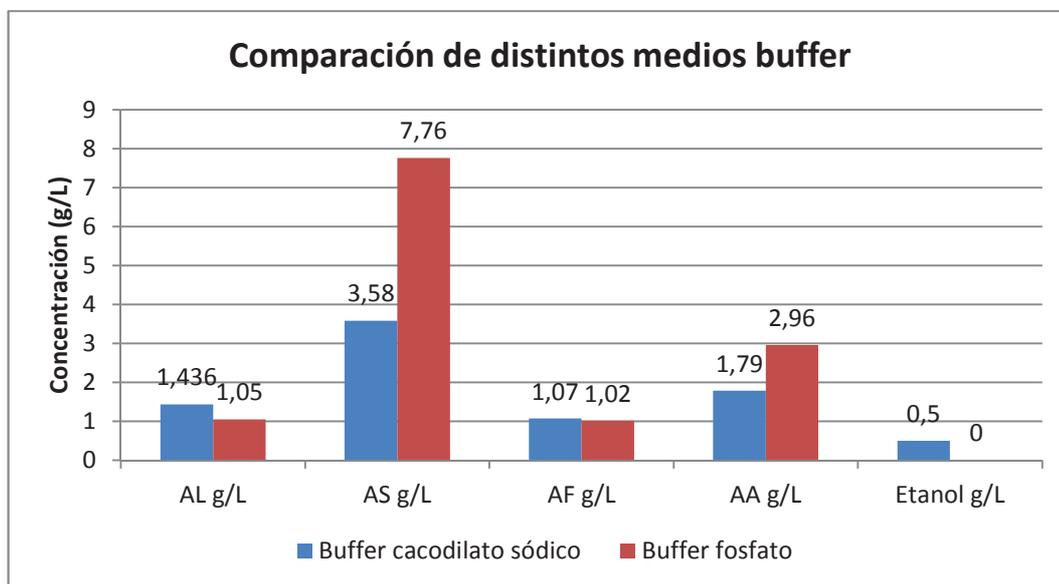


Figura 33. Comparación de distintos medios buffer en ensayos con manitol. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.5.1. y 1.5.2.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.5.1.	3,580	0,037	0,591	1,473	0,440	0,737	0,206
1.5.2.	7,760	0,081	0,174	1,285	0,169	0,490	0,000

Tabla 21. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.5.1. y del Ensayo 1.5.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

El ensayo con medio buffer de fosfato da lugar a una concentración mucho mayor de ácido succínico, algo mayor de ácido acético, y menor del resto de compuestos.

Las condiciones de operación anaerobias con flujo de CO_2 dan lugar a que el producto mayoritario sea ácido succínico.

La utilización de sustrato como manitol da mejores resultados en cuanto a la obtención de ácido succínico que otros sustratos. Esto es debido a que el uso de azúcares más reducidos da lugar a un incremento en la producción de ácido succínico en comparación con otros azúcares como la glucosa (45).

De utilizar medio buffer la mejor opción es el de fosfato pues da lugar a un aumento en la producción de ácido succínico.

1.6. Ensayos con suero lácteo

1.6.1. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones aerobias y sin adición de Na_2CO_3 . A uno de los ensayos no se le adicionó medio buffer (Ensayo 1.6.1.) y a otro sí, de cacodilato sódico (Ensayo 1.6.2.). Los resultados se muestran en la Figura 34 y en la Tabla 22.

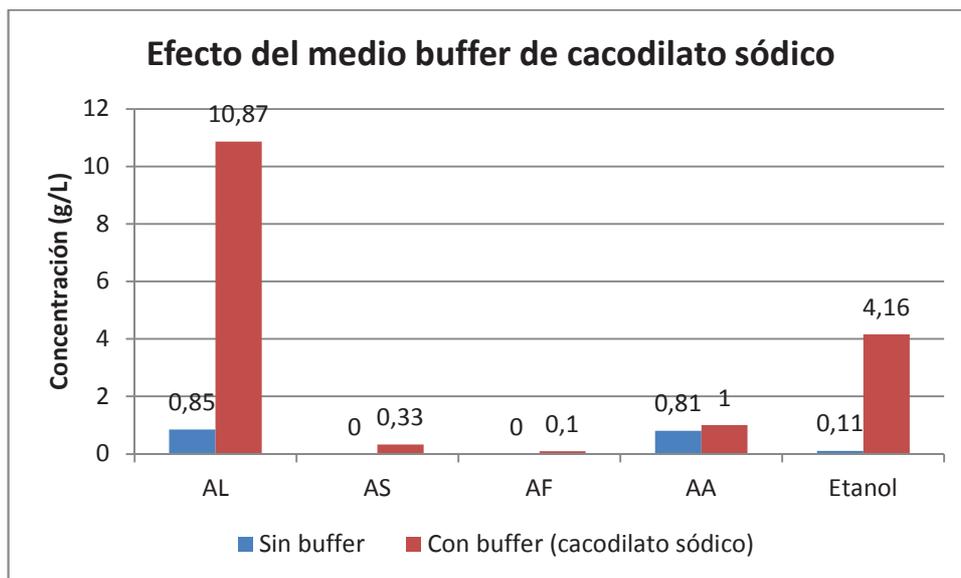


Figura 34. Efecto del medio buffer de cacodilato sódico en ensayos con suero lácteo. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.6.1. y 1.6.2.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	$Y_{AL/S}$ (g/g)	$Y_{AS/S}$ (g/g)	$Y_{AF/S}$ (g/g)	$Y_{AA/S}$ (g/g)	$Y_{E/S}$ (g/g)
1.6.1.	0,850	0,009	0,556	0,000	0,000	0,529	0,072
1.6.2.	10,870	0,113	0,742	0,023	0,007	0,068	0,284

Tabla 22. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.6.1. y del Ensayo 1.6.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones aerobias da lugar a que el producto mayoritario sea el ácido láctico.

La adición de medio buffer da lugar a un considerable incremento en la concentración de ácido láctico. También aumenta la concentración de los otros compuestos.

Resulta por tanto muy beneficioso utilizar medio buffer pues aumenta enormemente la producción del producto de interés.

1.6.2. Efecto del Na_2CO_3

Se comparan ensayos llevado a cabo en condiciones aerobias y con adición de medio buffer. A un ensayo no se le adicionó Na_2CO_3 (Ensayo 1.6.2.) y a otro sí, en concentración 2 g/L (Ensayo 1.6.3.). Los resultados se muestran en la Figura 35 y en la Tabla 23.

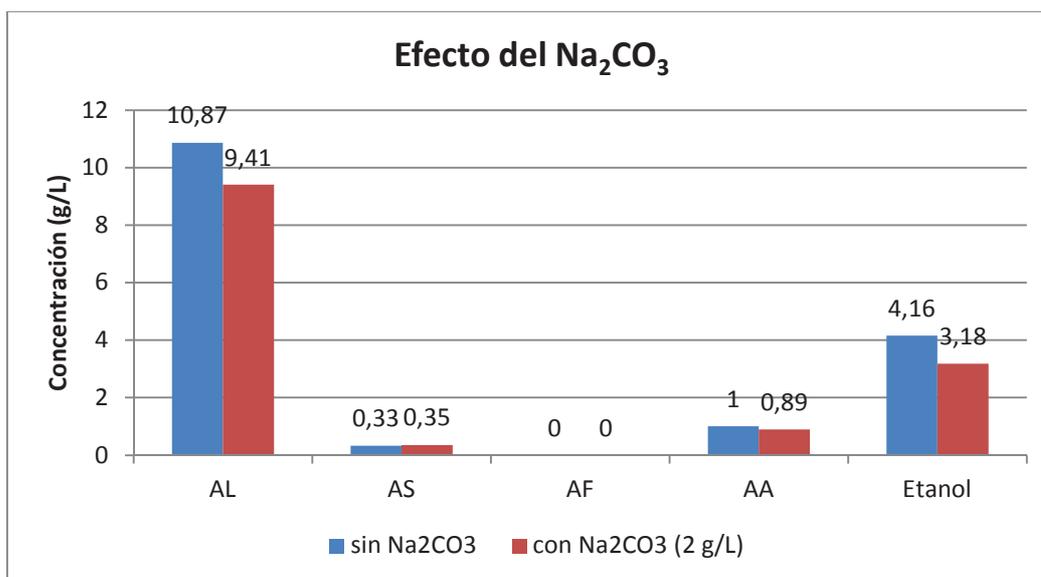


Figura 35. Efecto del Na_2CO_3 en ensayos con suero lácteo. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.6.2. y 1.6.3.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.6.2.	10,870	0,065	0,742	0,023	0,007	0,068	0,284
1.6.3.	9,410	0,056	1,002	0,037	0,000	0,095	0,339

Tabla 23. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.6.2. y del Ensayo 1.6.3. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones aerobias da lugar a que el producto mayoritario sea ácido láctico.

El uso de Na_2CO_3 disminuye la concentración de todos los compuestos excepto de ácido succínico. También da lugar a un menor consumo de sustrato pues sirve al microorganismo como fuente de carbono (Anexo I).

La utilización de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L aumenta el rendimiento pero no aumenta la producción.

1.6.3. Efecto de distintas concentraciones de Na₂CO₃ sin flujo de CO₂

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias sin flujo de CO₂ y sin adición de medio buffer. En un ensayo se adicionó Na₂CO₃ en concentración 2 g/L (Ensayo 1.6.4.) y a otro en otro 10 g/L (Ensayo 1.6.6.). Los resultados se muestran en la Figura 36 y en la Tabla 24.

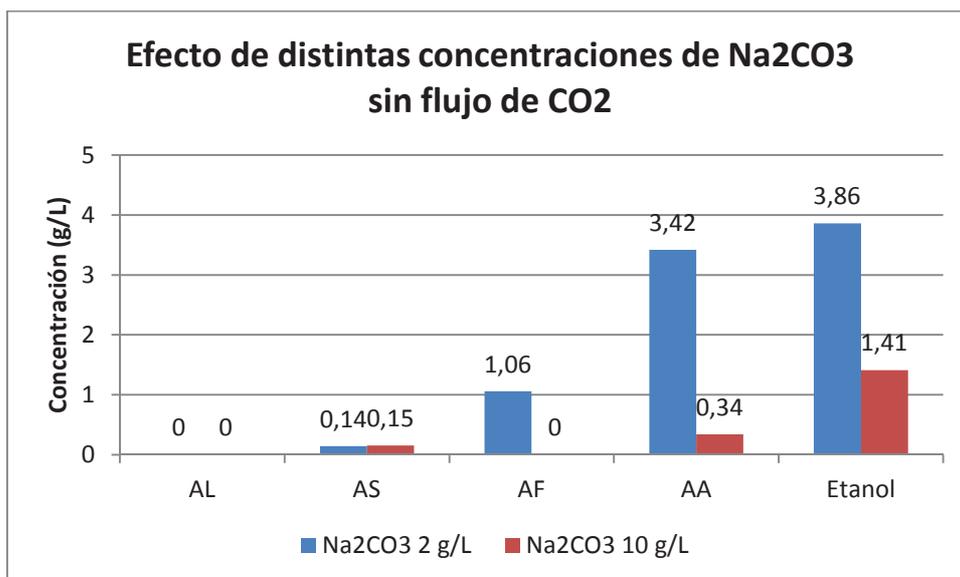


Figura 36. Efecto de distintas concentraciones de Na₂CO₃ sin flujo de CO₂ en ensayos con suero lácteo. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.6.4. y 1.6.6.)

Ensayo	P	Prod.	Y _{AL/S}	Y _{AS/S}	Y _{AF/S}	Y _{AA/S}	Y _{E/S}
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.6.4.	0,140	0,001	0,000	0,009	0,067	0,217	0,245
1.6.6.	0,150	0,001	0,000	0,064	0,000	0,146	0,605

Tabla 24. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.6.4. y del Ensayo 1.6.6. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones anaerobias da lugar a que el producto mayoritario sea ácido succínico.

La concentración máxima de succínico y la mínima de subproductos se alcanzan con una concentración de Na_2CO_3 de 10 g/L. Además la adición de mayor cantidad de Na_2CO_3 supone un menor consumo de sustrato (Anexo I).

La concentración idónea de entre las dos es la de 10 g/L pues aumenta producción y rendimiento de ácido succínico.

1.6.4. Efecto de distintas concentraciones de Na_2CO_3 con flujo de CO_2

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 y sin adición de medio buffer. En un ensayo se adicionó Na_2CO_3 en concentración 2 g/L (Ensayo 1.6.5.) y en otro 10 g/L (Ensayo 1.6.7.). Los resultados se muestran en la Figura 37 y en la Tabla 25.

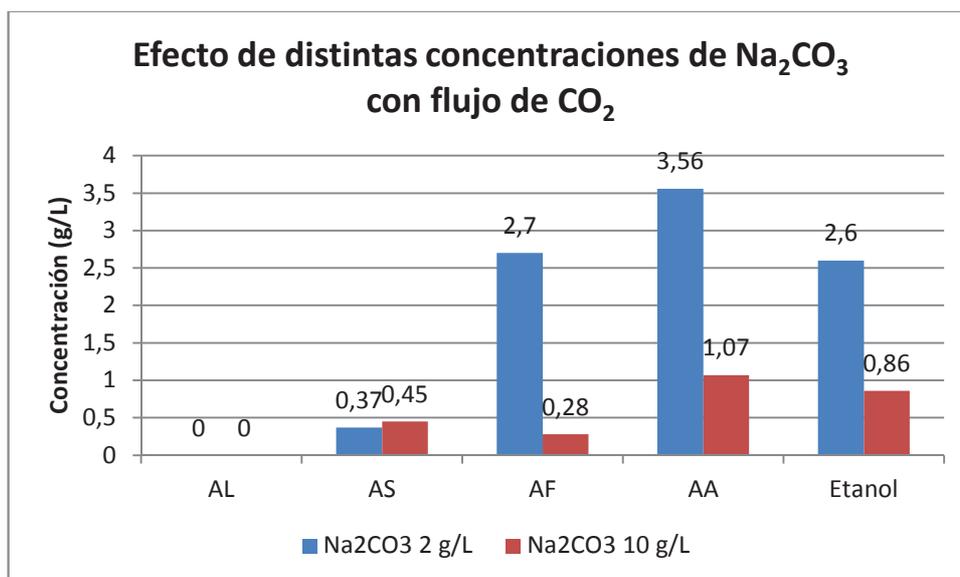


Figura 37. Efecto de distintas concentraciones de Na_2CO_3 con flujo de CO_2 en ensayos con suero lácteo. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.6.5. y 1.6.7.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.6.5.	0,370	0,002	0,000	0,159	1,164	1,534	1,121
1.6.7.	0,450	0,002	0,000	1,364	0,848	3,242	2,606

Tabla 25. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.6.5. y del Ensayo 1.6.7. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 da lugar a que el ácido succínico sea el producto mayoritario, y a que esté en mayor concentración que cuando no hay flujo de CO_2 (Ensayo 1.6.4. y 1.6.6.).

A mayor concentración de Na_2CO_3 se obtiene mayor concentración de ácido succínico y mucho menor de subproductos. Además aumenta el rendimiento por disminuir el consumo de sustrato (Anexo I).

Resulta beneficioso el uso de una mayor concentración de Na_2CO_3 por aumentar producción y rendimiento de ácido succínico.

1.7. Comparación de distintos sustratos y modos de operación

1.7.1. Ensayos en condiciones aerobias, 2 g/L de Na₂CO₃ y con medio buffer de cacodilato sódico

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones aerobias, con adición de Na₂CO₃ en concentración 2 g/L y con adición de medio buffer de cacodilato sódico. Uno de los ensayos empleaba como sustrato glucosa (Ensayo 1.1.3.), otro una mezcla de glucosa y lactosa en co-fermentación (Ensayo 1.3.3.) y otro suero lácteo (Ensayo 1.6.3.). Los resultados se muestran en la Figura 38 y en la Tabla 26.

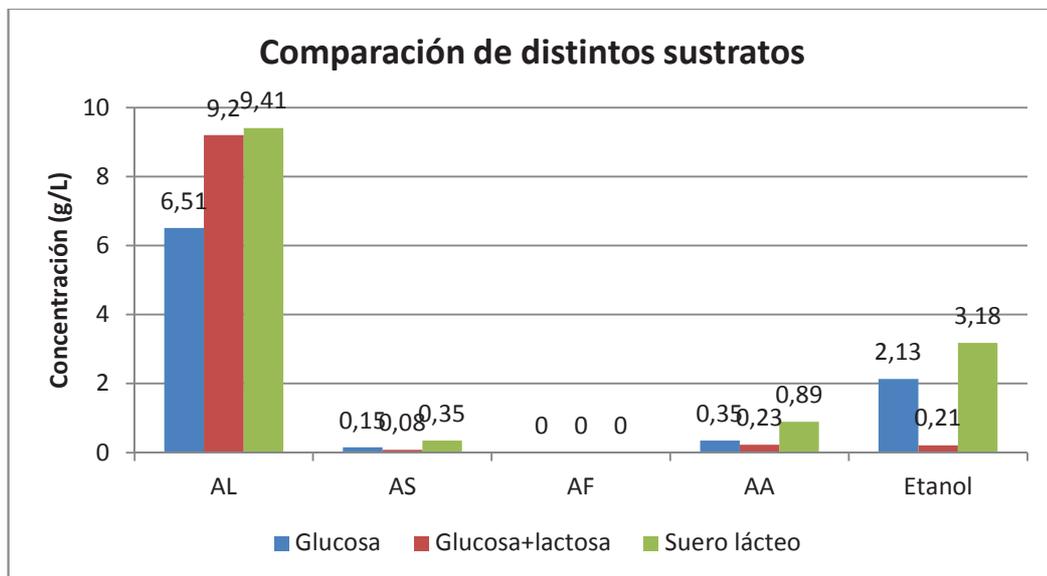


Figura 38. Comparación de distintos sustratos en ensayos en condiciones aerobias, 2 g/L de Na₂CO₃ y con medio buffer de cacodilato sódico). Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.3., 1.3.3. y 1.6.3.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.1.3..	6,510	0,039	0,741	0,017	0,000	0,040	0,242
1.3.3.	9,200	0,055	0,855	0,007	0,000	0,021	0,020
1.6.3.	9,410	0,056	1,002	0,037	0,000	0,095	0,339

Tabla 26. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.3., del Ensayo 1.3.3. y del Ensayo 1.6.3. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

La operación en condiciones aerobias lleva a que el producto mayoritario sea el ácido láctico.

El ensayo con suero lácteo es el que da lugar a una mayor producción de todos los compuestos. El ensayo en co-fermentación da lugar a un mayor rendimiento respecto al ácido láctico, con muy pocos subproductos, y con una producción cercana a la del suero lácteo.

Aunque no son las condiciones que permiten la mayor producción de ácido láctico, se puede decir que dados los resultados el sustrato mezcla de glucosa y lactosa sería el más adecuado para la obtención del producto deseado, pues da lugar a una producción cercana a la máxima que proporciona el aprovechamiento de suero lácteo, y a un rendimiento superior al del resto de sustratos estudiados en esta situación.

1.7.2. Ensayos con doble período de fermentación, 2 g/L Na_2CO_3 y con medio buffer de fosfato.

Se comparan ensayos llevados a cabo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO_2), con adición de Na_2CO_3 en concentración 2 g/L y con adición de medio buffer de fosfato. En un ensayo el sustrato fue glucosa (Ensayo 1.1.5.), en otro lactosa (Ensayo 1.2.6.) y en otro glicerol (Ensayo 1.4.2.). Los resultados se muestran en la Figura 39, en la Figura 40 y en la Tabla 27.

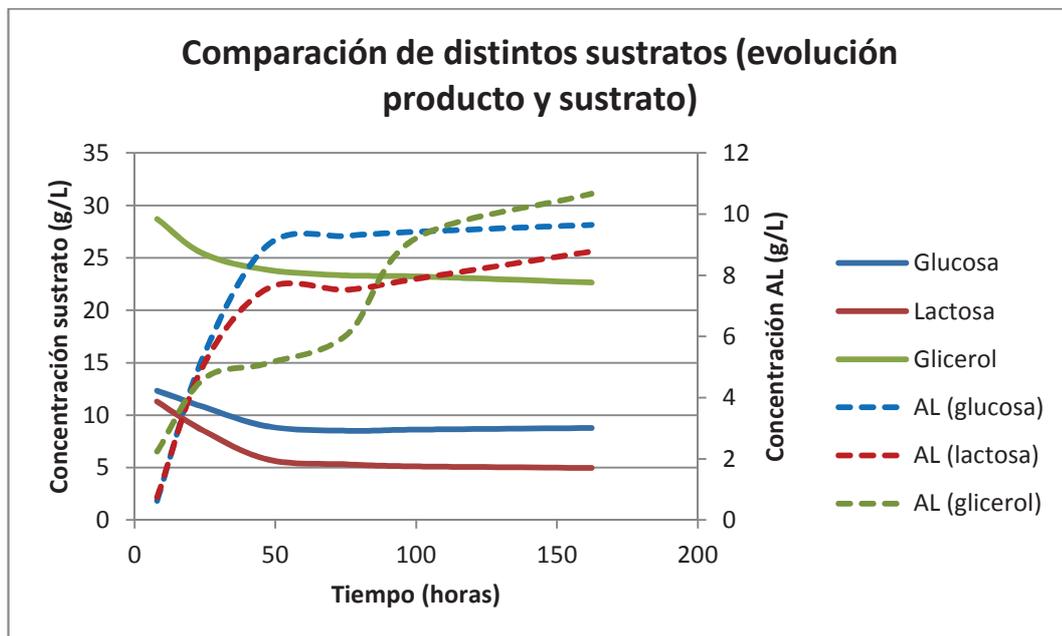


Figura 39. Comparación de distintos sustratos (evolución producto y sustrato) en ensayos con doble período de fermentación, 2 g/L Na_2CO_3 y medio buffer de fosfato. AL, ácido láctico. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.5., 1.2.6. y 1.4.2.)

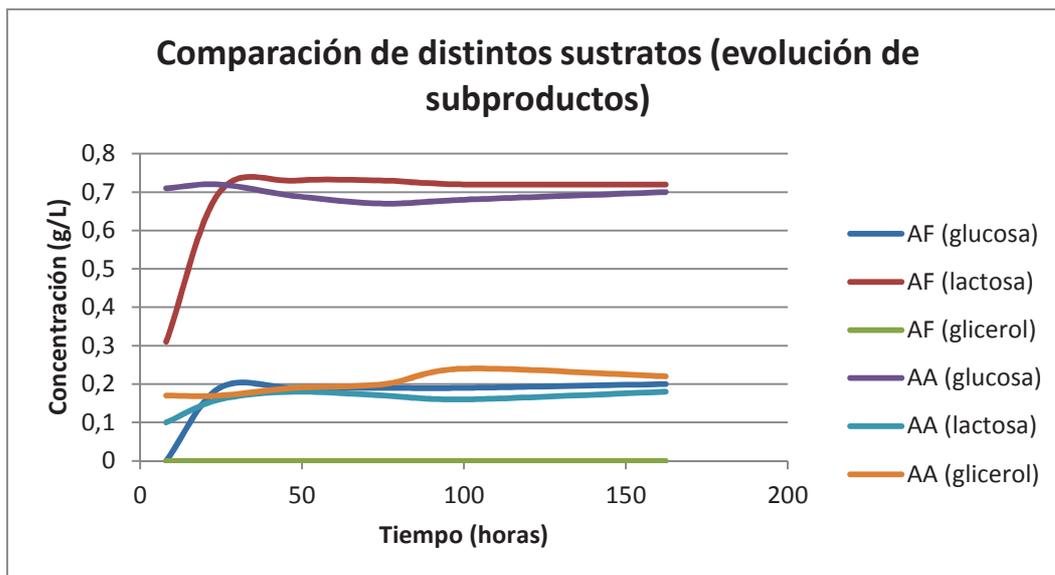


Figura 40. Comparación de distintos sustratos (evolución de subproductos) en ensayos con doble período de fermentación, 2 g/L de Na₂CO₃ y medio buffer de fosfato. AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayos 1.1.5., 1.2.6. y 1.4.2.)

Ensayo	P (g/L)	Prod. (g/Lh)	Y _{AL/S} (g/g)	Y _{AS/S} (g/g)	Y _{AF/S} (g/g)	Y _{AA/S} (g/g)	Y _{E/S} (g/g)
1.1.5.	9,650	0,059	0,672	0,000	0,014	0,049	0,000
1.2.6.	8,780	0,054	0,406	0,000	0,033	0,008	0,000
1.4.2.	10,67	0,066	1,450	0,019	0,000	0,030	0,000

Tabla 27. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.1.5., del Ensayo 1.2.6. y del Ensayo 1.4.2. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato.

El doble período de fermentación da lugar a que el producto mayoritario sea el ácido láctico.

La glucosa da lugar a una mayor concentración de ácido láctico respecto a la lactosa, y además se consume menos. El glicerol es sin embargo el sustrato que menos se consume y el que da lugar a la mayor concentración de ácido

láctico. Puede apreciarse como en el caso del glicerol, tras el primer período aerobio tienen lugar unas horas de adaptación a las nuevas condiciones, tras lo cual la concentración de ácido láctico y de ácido acético crece exponencialmente. Otra ventaja del uso de glicerol es que el único subproducto es ácido acético, no obteniéndose ácido fórmico como sí se obtiene con glucosa y con lactosa. La glucosa da lugar a mayor concentración de ácido acético que la lactosa, mientras que la lactosa da lugar a una mayor concentración de ácido fórmico que la glucosa.

De entre los tres sustratos estudiados en estas condiciones, las más propicias para la obtención de ácido láctico, el mejor resulta ser el glicerol, por la mayor producción y productividad.

1.7.3. Ensayos en condiciones anaerobias con flujo de CO₂, 2 g/L de Na₂CO₃ y sin medio buffer.

Se comparan ensayos llevados a cabo en condiciones anaerobias con flujo de CO₂, con adición de Na₂CO₃ en concentración 2 g/L y sin adición de medio buffer. En un ensayo se utilizó como sustrato lactosa (Ensayo 1.2.4.) y en otro suero lácteo (Ensayo 1.6.5.). Los resultados se muestran en la Figura 41 y en la Tabla 28.

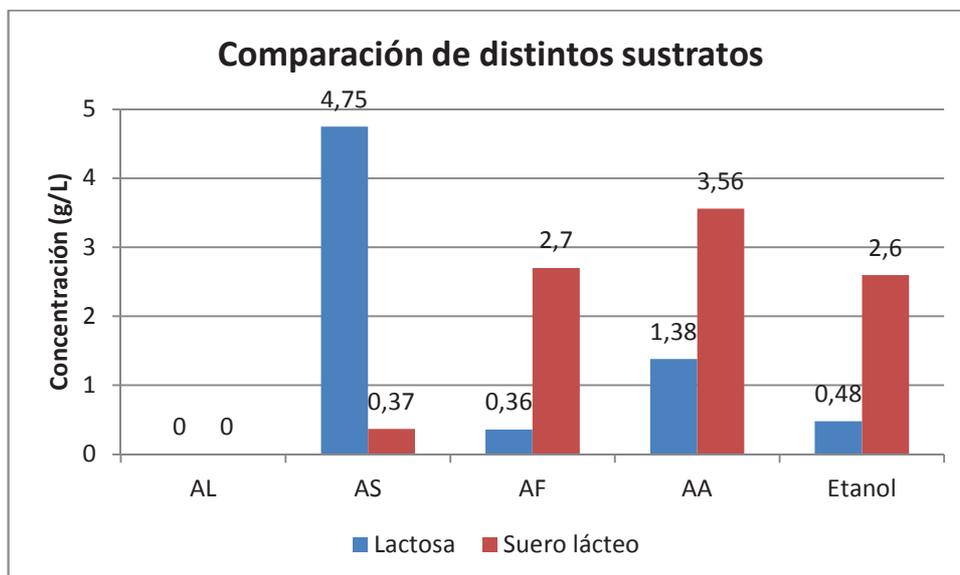


Figura 41. Comparación de distintos sustratos en ensayos en condiciones anaerobias con flujo de CO₂, 2 g/L de Na₂CO₃ y sin medio buffer. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayo 1.2.4. y Ensayo 1.6.5.)

Ensayo	P	Prod.	$Y_{AL/S}$	$Y_{AS/S}$	$Y_{AF/S}$	$Y_{AA/S}$	$Y_{E/S}$
	(g/L)	(g/Lh)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)	(g/g)
1.2.4.	4,750	0,025	0,000	1,806	0,137	0,525	0,183
1.6.5.	0,370	0,002	0,000	0,159	1,164	1,534	1,121

Tabla 28. Parámetros de fermentación del Ensayo 1.2.4. y del Ensayo 1.6.5. Detalles en Anexo II. P, producción; Prod., productividad; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato.

Las condiciones de operación anaerobias con flujo de CO_2 dan lugar a que el producto mayoritario sea el ácido succínico.

La utilización del sustrato modelo lactosa proporciona una producción y rendimiento de ácido succínico mucho mayores que el sustrato natural suero lácteo, que no ha recibido ningún tipo de tratamiento previo salvo la esterilización. Aun así, sí que se obtiene una pequeña concentración de ácido succínico con el suero lácteo.

La lactosa pura da lugar a mejores resultados que el suero lácteo.

2. Ensayos en biorreactor

2.1. Ensayos con lactosa

2.1.1. Ensayo en condiciones de obtención mayoritaria de ácido succínico

El Ensayo 2.1.1. se llevó a cabo con cepa original, que conservaba la morfología intacta de cuando se adquirió el microorganismo, como puede apreciarse en la Figura 12. Se cultivó en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 , con adición de 5 g/L de NaHCO_3 y con medio buffer de cacodilato sódico. Los resultados se muestran en la Figura 42, en la Figura 43 y en la Tabla 29.

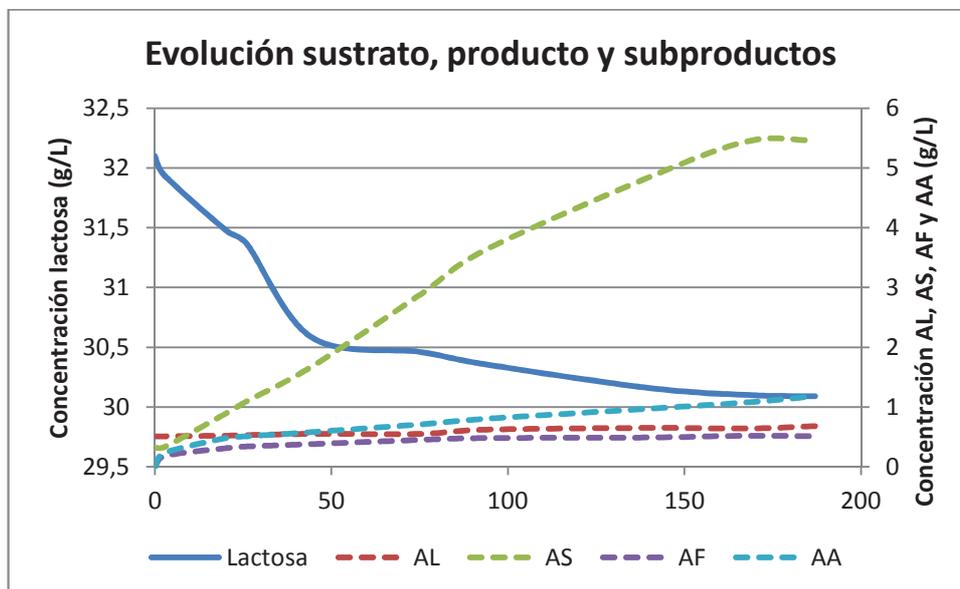


Figura 42. Evolución sustrato, producto y subproductos en ensayo en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 , 5 g/L NaHCO_3 y buffer de cacodilato sódico. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico, AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.1.)

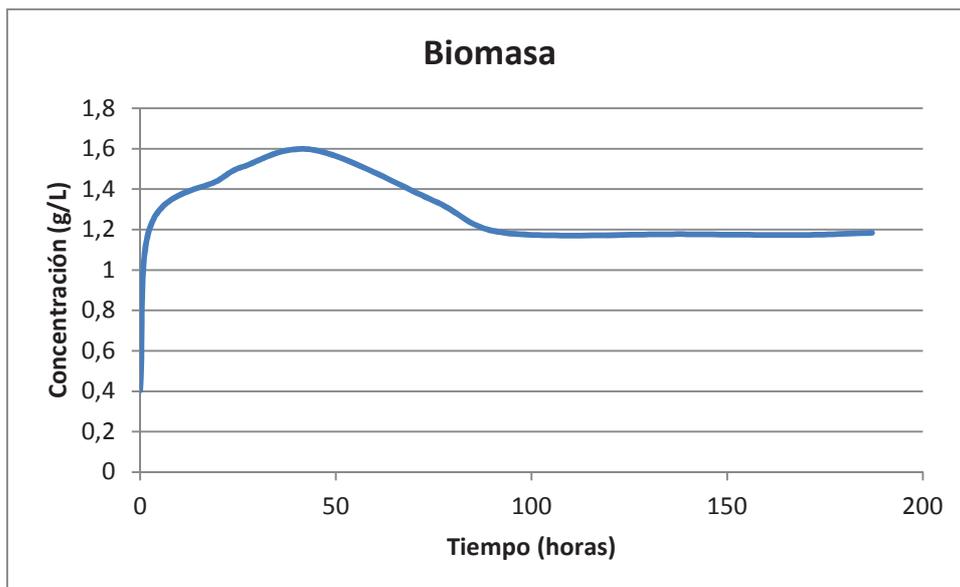


Figura 43. Evolución biomasa en ensayo en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 , 5 g/L NaHCO_3 y buffer de cacodilato sódico. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.1.).

Ensayo	2.1.1.
Producción (g/L)	5,460
Productividad (g/Lh)	0,029
$Y_{\text{AL/S}}$ (g/g)	0,073
$Y_{\text{AS/S}}$ (g/g)	0,590
$Y_{\text{AF/S}}$ (g/g)	0,055
$Y_{\text{AA/S}}$ (g/g)	0,127
$Y_{\text{E/S}}$ (g/g)	0,000
$X_{\text{máx.}}$ (g/L)	1,593
$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)	1,547
μ (h ⁻¹)	0,208

Tabla 29. Parámetros de fermentación del Ensayo 2.1.1. Detalles en Anexo II. $Y_{\text{AL/S}}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{\text{AL/S}}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{\text{AS/S}}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{\text{AF/S}}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{\text{AA/S}}$, rendimiento ácido acético-sustrato; $X_{\text{máx.}}$, concentración máxima de biomasa; $Y_{\text{X/S}}$, rendimiento biomasa-sustrato; μ (h⁻¹), velocidad específica de crecimiento.

Las condiciones anaerobias con CO_2 dan lugar a que el producto mayoritario sea el ácido succínico.

Dado que la bibliografía (45) señala que la adición de donadores de hidrógeno aumenta la producción de ácido succínico, se operó con NaHCO_3 en lugar de con Na_2CO_3 , lo que ha permitido alcanzar la mayor concentración de ácido succínico hasta el momento. La bibliografía también señala la adición de Mg para una mayor obtención de ácido succínico (46), por lo que en lugar de añadirse 0,02 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pasó a añadirse 0,5 g/L.

Estas modificaciones han permitido además de una mayor concentración de ácido succínico, un mayor rendimiento pues la formación de subproductos es mínima. Las condiciones anaerobias han minimizado la concentración de etanol llevándola a cero.

2.1.2. Ensayo en condiciones óptimos para la obtención mayoritaria de ácido succínico

El Ensayo 2.1.2. se llevó a cabo con cepa original. Se operó en condiciones anaerobias con flujo de CO_2 , y se adicionó una cantidad superior de NaHCO_3 : 10 g/L. Se usó medio buffer de fosfato. En cuanto a las modificaciones, se mantuvo la última consistente en añadir 0,5 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y en este caso además se añadió 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (en lugar de 0,02 g/L) como se indica en cierta bibliografía (46). Los resultados se muestran en la Figura 44, en la Figura 45 y en la Tabla 30.

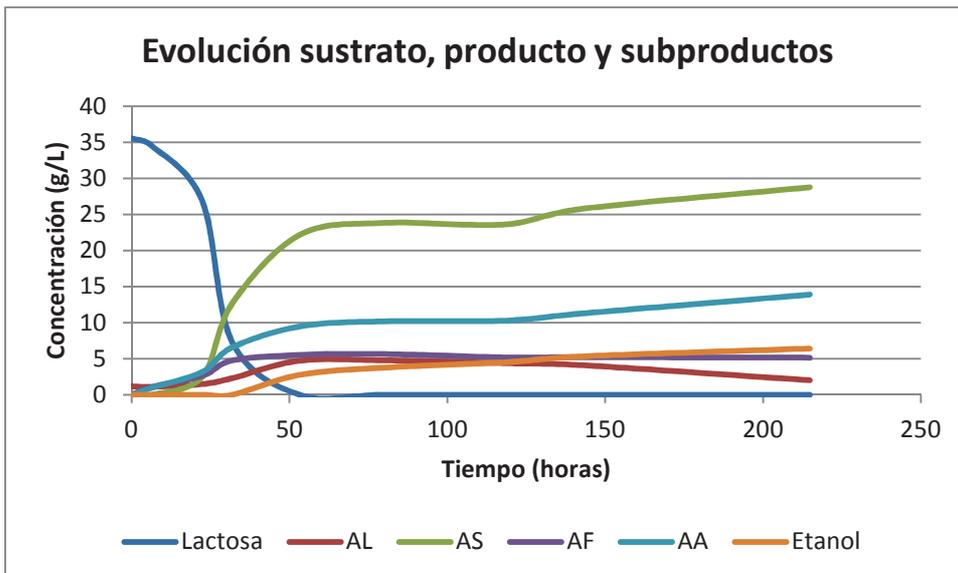


Figura 44. Evolución sustrato, producto y subproductos en ensayo en condiciones anaerobias con flujo de CO₂, 10 g/L de NaHCO₃ y medio buffer de fosfato. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.2.)

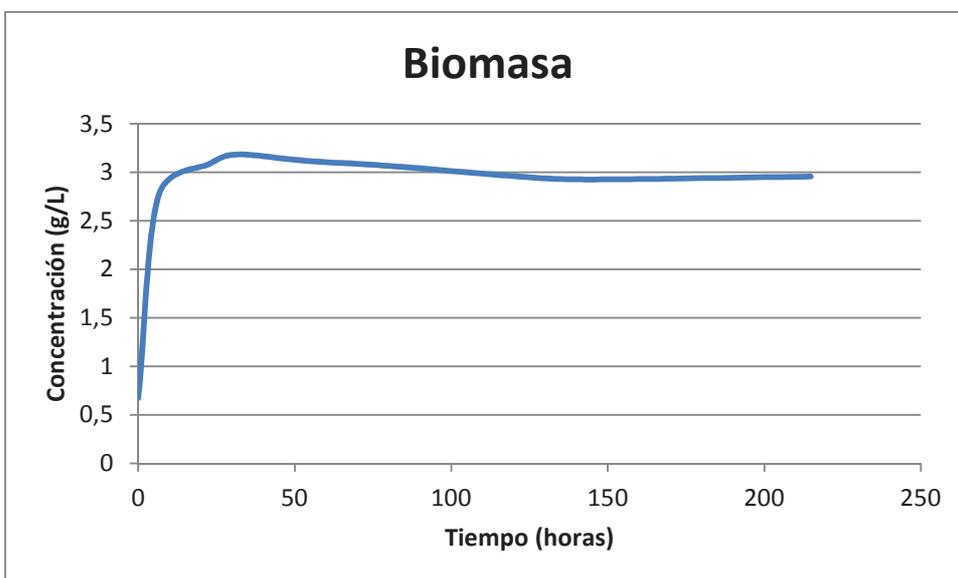


Figura 45. Evolución de biomasa en ensayo en condiciones anaerobias con flujo de CO₂, 10 g/L de NaHCO₃ y medio buffer de fosfato. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.2.)

Ensayo	2.1.2.
Producción (g/L)	28,764
Productividad (g/Lh)	0,134
$Y_{AL/S}$ (g/g)	0,050
$Y_{AS/S}$ (g/g)	0,721
$Y_{AF/S}$ (g/g)	0,129
$Y_{AA/S}$ (g/g)	0,348
$Y_{E/S}$ (g/g)	0,161
$X_{m\acute{a}x.}$ (g/L)	3,182
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,103
μ (h ⁻¹)	0,049

Tabla 30. Parámetros de fermentación del Ensayo 2.1.2. Detalles en Anexo II. $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato, $X_{m\acute{a}x.}$, concentración máxima de biomasa; $Y_{X/S}$, rendimiento biomasa-sustrato; μ (h⁻¹), velocidad específica de crecimiento.

Las condiciones anaerobias con CO₂ dan lugar a que el producto mayoritario sea el ácido succínico.

Las modificaciones en las variables han permitido una producción de ácido succínico muy superior a la alcanzada hasta ahora, aunque también ha aumentado considerablemente la concentración de subproductos. El subproducto mayoritario ha sido el ácido acético, al igual que en la bibliografía (37).

El sustrato se consumió completamente en las 50 primeras horas, tiempo tras el cual el microorganismo utilizó como fuente de carbono el NaHCO₃ y el CO₂ que se disuelve en el medio. La biomasa experimentó un fuerte aumento en pocas horas, tras lo cual le siguió un largo período estacionario.

Estas modificaciones han permitido además de una mayor concentración de ácido succínico, un mayor rendimiento pues la formación de subproductos es

mínima. Las condiciones anaerobias han minimizado la concentración de etanol llevándola a cero.

2.1.3. Ensayo en condiciones de obtención mayoritaria de ácido láctico.

El presente ensayo se llevó a cabo en condiciones aerobias, no se adicionó Na_2CO_3 y se adicionó medio buffer de cacodilato sódico. Los resultados se muestran en la Figura 46, en la Figura 47 y en la Tabla 31.

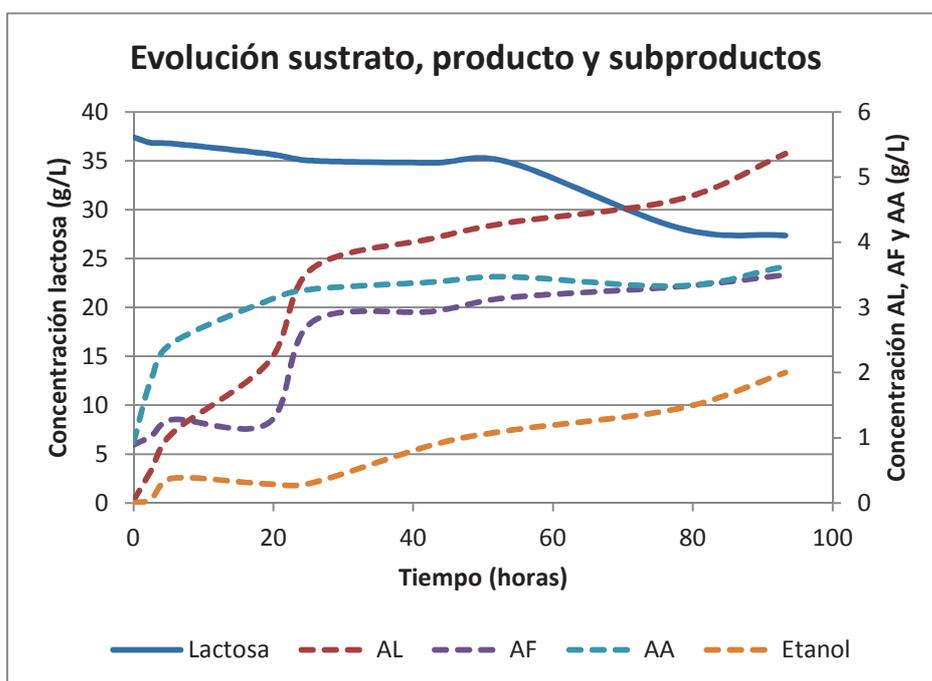


Figura 46. Evolución sustrato, producto y subproductos en ensayo en condiciones aerobias, sin Na_2CO_3 y con medio buffer de cacodilato sódico. AL, ácido láctico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.3.)

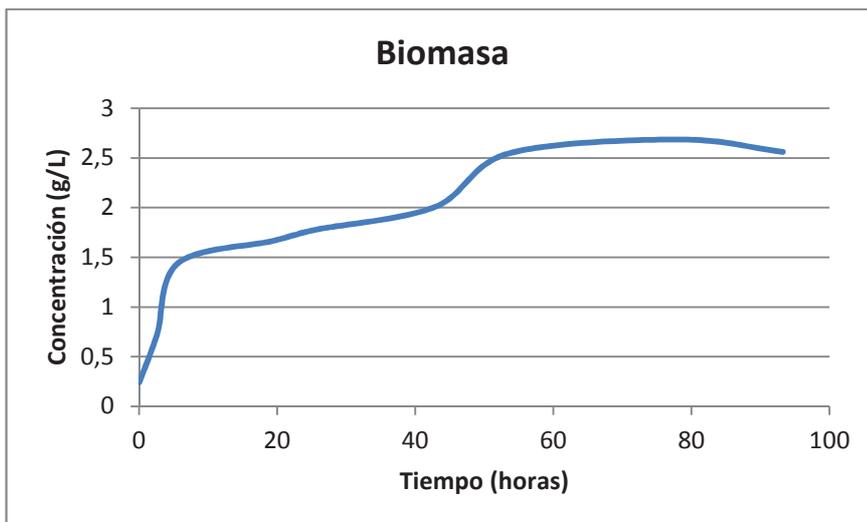


Figura 47. Evolución biomasa en ensayo en condiciones aerobias, sin Na_2CO_3 y con medio buffer de cacodilato sódico. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.3.)

Ensayo	2.1.3.
Producción (g/L)	5,360
Productividad (g/Lh)	0,057
$Y_{AL/S}$ (g/g)	0,570
$Y_{AS/S}$ (g/g)	0,000
$Y_{AF/S}$ (g/g)	0,372
$Y_{AA/S}$ (g/g)	0,386
$Y_{E/S}$ (g/g)	0,213
$X_{\text{máx.}}$ (g/L)	2,686
$Y_{X/S}$ (g/g)	1,349
μ (h^{-1})	0,163

Tabla 31. Parámetros de fermentación del Ensayo 2.1.3. Detalles en Anexo II. $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AL/S}$, rendimiento ácido láctico-sustrato; $Y_{AS/S}$, rendimiento ácido succínico-sustrato; $Y_{AF/S}$, rendimiento ácido fórmico-sustrato; $Y_{AA/S}$, rendimiento ácido acético-sustrato, $X_{\text{máx.}}$, concentración máxima de biomasa; $Y_{X/S}$, rendimiento biomasa-sustrato; μ (h^{-1}), velocidad específica de crecimiento.

Los resultados muestran que la operación en condiciones aerobias da lugar a que el ácido láctico sea el producto mayoritario y a que no se obtenga nada de ácido succínico. Gracias al uso de medio buffer se obtiene una concentración de producto y subproductos superior a la unidad.

2.1.4. Ensayo en condiciones óptimas para la obtención mayoritaria de ácido láctico

El presente ensayo se llevó a cabo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO_2). Se adicionó 1 g/L de Na_2CO_3 y medio buffer de fosfato. Los resultados se muestran en la Figura 48, en la Figura 49 y en la Tabla 32.

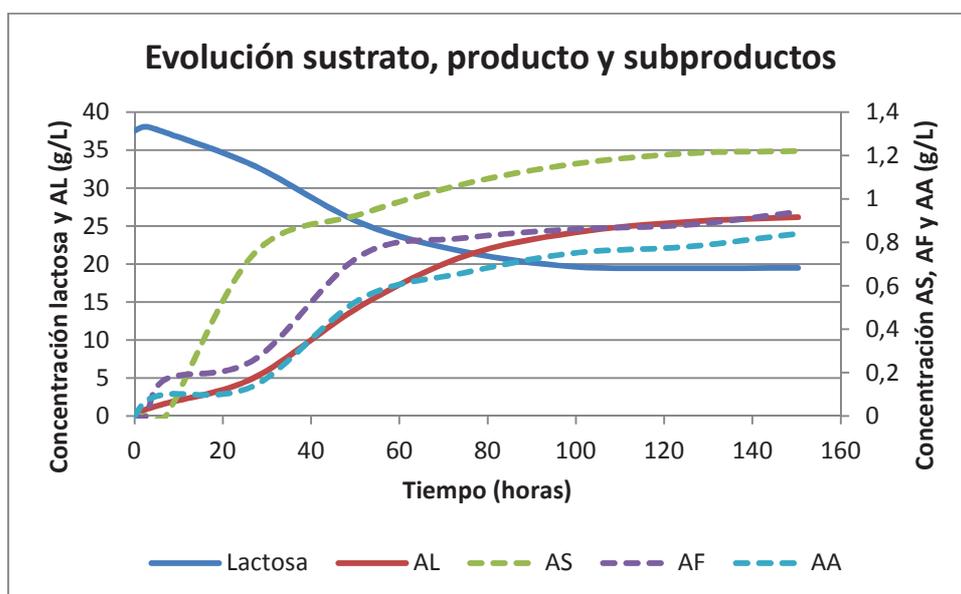


Figura 48. Evolución sustrato, producto y subproductos en ensayo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO_2), 1 g/L de Na_2CO_3 y medio buffer de fosfato. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.4.)

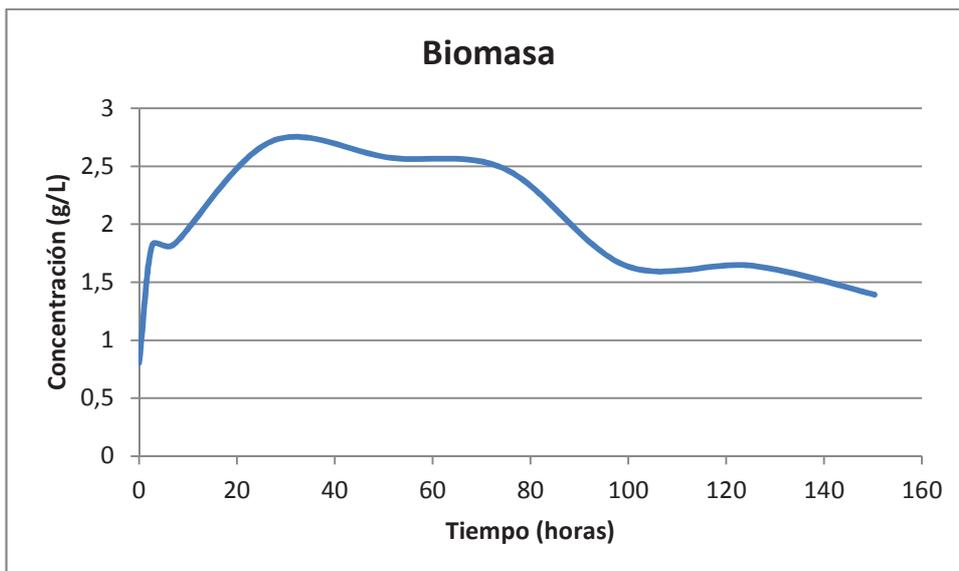


Figura 49. Evolución de biomasa en ensayo con doble período de fermentación (20 horas en aerobio y el resto del tiempo en anaerobio con CO₂), 1 g/L de Na₂CO₃ y medio buffer de fosfato. Detalles en Anexo I (Ensayo 2.1.4.)

Ensayo	2.1.4.
Producción (g/L)	26,170
Productividad (g/Lh)	0,174
Y_{AL/S} (g/g)	1,326
Y_{AS/S} (g/g)	0,062
Y_{AF/S} (g/g)	0,048
Y_{AA/S} (g/g)	0,043
Y_{E/S} (g/g)	0,000
X_{máx.} (g/L)	2,717
Y_{X/S} (g/g)	3,072
μ (h⁻¹)	0,163

Tabla 32. Parámetros de fermentación del Ensayo 2.1.4. Detalles en Anexo II. Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AL/S}, rendimiento ácido láctico-sustrato; Y_{AS/S}, rendimiento ácido succínico-sustrato; Y_{AF/S}, rendimiento ácido fórmico-sustrato; Y_{AA/S}, rendimiento ácido acético-sustrato, X_{máx.}, concentración máxima de biomasa; Y_{X/S}, rendimiento biomasa-sustrato; μ (h⁻¹), velocidad específica de crecimiento.

El doble período de fermentación da lugar a que el producto mayoritario sea el ácido láctico, y junto con la adición de medio buffer de fosfato se obtiene una elevada producción. La adición de Na_2CO_3 aumenta el rendimiento respecto al Ensayo 2.1.3., pues provoca una disminución en la concentración de subproductos (salvo el ácido succínico).

El período inicial en condiciones aerobias modifica la morfología del microorganismo, como se ve en la Figura 13. Una vez adquirida esta morfología el producto mayoritario es el ácido láctico.

Puede apreciarse como durante las primeras 20 horas aumenta considerablemente la producción de ácido láctico hasta valores próximos a 10 g/L, como se obtuvo en ensayos anteriores que operaron en aerobio. Tras esas 20 horas la concentración de ácido láctico continúa en aumento, ya con ventaja sobre el resto de compuestos los cuales aumentan considerablemente con la adición de carbono (CO_2).

El biorreactor permite un exhaustivo control de todas las variables que también ayuda a optimizar el proceso.

Conclusiones

1. Respecto a la operación con diferentes condiciones de cultivo, puede establecerse lo siguiente:
 - En condiciones anaerobias el producto mayoritario es ácido succínico.
 - Se obtiene una mayor concentración de ácido succínico operando en condiciones anaerobias, y con aporte de dióxido de carbono. Así mismo, se alcanzan valores mayores tanto en concentración de biomasa, como en rendimiento biomasa-sustrato y velocidad específica de crecimiento.
 - En condiciones aerobias el producto mayoritario es ácido láctico.
 - La mayor concentración de ácido láctico, se obtiene operando en fase dual (primer periodo aerobio seguido de otro anaerobio con flujo de dióxido de carbono).
 - La operación en condiciones aerobias da lugar a una modificación en la morfología del microorganismo respecto a la cepa original. Esta modificación es irreversible, y es la causa de que el ácido láctico sea el producto mayoritario. Una vez adquirida esta morfología, un cambio en las condiciones de cultivo no modificará la ruta metabólica. Debido a ello, es posible la operación en doble periodo utilizando dióxido de carbono como fuente de carbono alternativa sin que por ello se modifique la ruta metabólica ya seguida por el microorganismo.
2. En cuanto a las variables de operación y su influencia en la obtención de los ácidos orgánicos, puede establecerse lo siguiente:

2.1. Ácido succínico

- Sustrato.

El sustrato idóneo de los estudiados es el manitol, pues al ser un compuesto más reducido aporta hidrógeno, que actúa como donador de electrones favoreciendo la formación de ácido succínico. La utilización de lactosa también proporciona valores sustanciales de ácido.

El empleo de suero lácteo proporciona menores concentraciones de ácido succínico; el rendimiento es bajo debido a la abundante presencia de diversos componentes que no son lactosa en su composición. Sería necesario por tanto un tratamiento previo del sustrato natural que lo acondicionara para el bioproceso y permitiera obtener mejores resultados.

- Adición de medio buffer y tipo de medio buffer.

La adición de medio buffer aumenta la producción aunque no de forma tan significativa como en los ensayos de obtención de ácido láctico. De entre los dos medios buffer estudiados, se ha comprobado que el de fosfato eleva la producción, la productividad y el rendimiento respecto al de cacodilato sódico. Esto puede ser debido a que la cantidad de fosfato que contiene el medio no es suficiente, y por tanto la adición de medio buffer fosfatado resulta beneficiosa. También puede deberse al hecho de que el sodio provoca cierto efecto inhibitorio en las fermentaciones, y teniendo en cuenta que ya está presente en el medio, la adición extra por medio de cacodilato sódico puede resultar excesiva para el microorganismo.

- Adición de carbonato sódico (Na_2CO_3).

La adición de este compuesto aumenta la concentración del producto de interés y por regla general disminuye la de ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol. Es debido a que aporta dióxido de carbono al medio, favoreciendo así la ruta metabólica hacia ácido succínico. También se ha visto que sirve como fuente de carbono, mejorando además de la producción el rendimiento. Cuanto mayor sea la concentración de carbonato sódico, más acentuados son los efectos.

- Adición de hidrógeno carbonato sódico (NaHCO_3).

La utilización de este compuesto en lugar de carbonato sódico supone una mejora en la obtención de ácido succínico, pues además de aportar dióxido de carbono y servir como fuente de carbono alternativa, aporta hidrógeno que actúa como donador de electrones, lo que favorece la ruta de obtención de ácido succínico. Cuanto mayor sea la concentración de hidrógeno carbonato sódico, más acentuados son los efectos.

- Adición de magnesio.

Se ha comprobado que un aumento de la concentración de magnesio en el medio (de 0,02 g/L a 0,5 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) da lugar a mejores resultados, pues la concentración de subproductos disminuye.

- Adición de calcio.

Se ha comprobado que un aumento en la concentración de calcio en el medio (de 0,02 g/L a 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) da lugar a mejores resultados, pues la producción de todos los compuestos aumenta, especialmente la de ácido succínico.

2.2. Ácido láctico

- Sustrato

Tras los ensayos se concluye que el sustrato idóneo es el glicerol, con el que se lleva a cabo un proceso de respiración aerobia que da lugar a una elevada producción, rendimiento y crecimiento del microorganismo. El suero lácteo también da lugar a buenos resultados, aunque el rendimiento no ha sido tan elevado como con el resto de sustratos debido a los subproductos. Un sistema de co-fermentación mezcla de glucosa y lactosa permite alcanzar una producción cercana a la del suero lácteo y un rendimiento considerablemente superior.

La obtención biotecnológica de ácido láctico presenta por tanto la ventaja de aprovechar directamente un subproducto industrial como el suero lácteo, sin necesidad de tratamiento previo, así como la posible valorización de residuos de la industria del biodiesel como indican los buenos resultados obtenidos con glicerol.

- Adición de medio buffer y tipo de medio buffer

La adición de medio buffer es fundamental para una producción significativa, pues la elevada acidez del ácido láctico da lugar a que una pequeña concentración pueda inhibir el metabolismo microbiano de no regularse el pH del medio. En este caso, al igual que en la obtención de ácido succínico, el medio buffer de fosfato ofrece los mejores resultados.

- Adición de carbonato sódico (Na_2CO_3).

La adición de este compuesto ha dado lugar a una ligera disminución en la concentración de todos los productos de la fermentación excepto de ácido succínico, pues favorece la ruta hacia la obtención de éste. Es estas condiciones, sin embargo, aunque no aumenta la producción de ácido láctico, aumenta el rendimiento pues actúa como fuente de



carbóno alternativa. Como el microorganismo se ha sometido a un periodo aerobio, la adición de dióxido de carbóno en forma de carbonato sódico no impide que el ácido láctico sea el producto mayoritario, a pesar de que sí disminuye ligeramente su concentración. Cuanto mayor sea la concentración de carbonato sódico, más acentuados son los efectos.

Referencias

- (1) Ficha de datos de Seguridad Ácido Succínico de Base Biológica. Versión 1.0. BioAmber
- (2) Principales ácidos carboxílicos y sus aplicaciones. 20-Junio-2006. QuimiNet.com.
<www.quiminet.com/articulos/principales_acidos_carboxilicos_y_sus_aplicaciones_2706283.htm>
(03/05/15)
- (3) Ácido succínico. EcuRed.
<http://www.ecured.cu/index.php/%C3%81cido_succ%C3%ADnico>
(03/05/2015)
- (4) Oxalic acid dehydrate, Chemicalland21.
<<http://www.chemicalland21.com/industrialchem/organic/OXALIC%20ACID.htm>>
(08/06/2015)
- (5) J. Beauprez, M. De Mey y W. Soetaert. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochem.*, vol. 45, p. 1103, 2010.
- (6) Erini Adamopoulou. Poly(butylene succinate): A Promising Biopolymer. Department of Industrial Management and Technology. School of Chemical Engineering. 2012.
- (7) Patel M, Crank M, Dornburg V, Hermann B, Roes L, Hüsing B, Overbeek van L, Terragni F, Recchia E. Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources. The BREW Project. 2006.
- (8) H. Grafje, W. orming, H.-M. Weitz, W. Reiss, G. Steffan, H. Diehl, H. Bosche y K. Schneider. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, 2007
- (9) José Miguel Pinazo de la Cruz. Valorización de derivados de la biomasa: Síntesis catalítica de gamma-butirolactona a partir de ácido succínico y derivados. Universidad Politécnica de Valencia. 2012.
- (10) N-metil-2-pirrolidona. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional de acrilato de n-metil-2-pirrolidona. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.
- (11) Succinimida, Gran Enciclopèdia Catalana, [enciclopedia.cat](http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0144163.xml).
<<http://www.enciclopedia.cat/EC-GEC-0144163.xml>>
(11/05/2015)
- (12) H. Song y S. Lee. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, p. 352, 2006.

- (13) Jeremy Bernard Bp Chemicals Limited Cooper, Process for the recovery of succinic acid from its mixtures with other carboxylic acids EP 0274887 A1, 17-12-1988.
<www.google.com/patents/EP0274887A1?cl=en>
(06/06/2015)
- (14) Zhao, Yong Xiang; Zhang, Yin; Sun, Zijin; Luo, Caiping; Zhang, Hongxi; Liu, Hailong; Zhao, Lili; Li, Haitao. Continuous co-production process of succinic anhydride and succinic acid by two-stage hydrogenation of maleic anhydride with supported nickel as catalyst. Assignee: Shanxi University, Peop. Rep. China. CN 103570650 A, p. 1, 2014.
- (15) Chemical industry awaits for bio-succinic acid potential, 30-01-2012, ICIS Chemical Business,
<<http://www.icis.com/resources/news/2012/01/30/9527521/chemical-industry-awaits-for-bio-succinic-acid-potential/>>
(05/06/2015)
- (16) McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol Biotechnol* 76:727-740, 2007.
- (17) Willke Th, Vorlop K-D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *App. Microbial Biotechnol.* 2004; 66:131-42.
- (18) Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85(3):413-23.
- (19) Wee, Y. J., Kim, J. N., and Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology.* 44:163-172.
- (20) Lactic acid safe & natural,
<http://www.lactic-acid.com/physical_properties.html>
(10/07/2015)
- (21) Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, Moon SH, Frank JR (1995). Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev* 16/23: 221-231.
- (22) Basa Janakiram Naveena, Mohammad Altaf, Kalva Bhadrappa and Gopal Reddy. Production of L(+) Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Semi-Solid State Fermentation Using Wheat Bran
- (23) Niju Narayanan, Pradip K. Roychoudhury, Aradhana Srivastava. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458. 2004.
- (24) Varadarajan, D.J. Miller, Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids, *Biotechnol. Progr.* 15 (1999) 845-854.

- (25) Roslina Rashid. Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering. Universiti Teknologi Malaysia. 2008.
- (26) Niju Narayanan, Pradip K. Roychoudhury, Aradhana Srivastava. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. 2004.
- (27) Carlos A. García, Guillermo S. Arrázola, Alba M. Durango. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. Temas Agrarios Vol. 15(2) Julio-Diciembre 2010 (9-26).
- (28) Hofvendahl, K. y Hägerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology 26: 87-107.
- (29) L. Serna Cock, A. Rodríguez de Stouvenel. Producción biotecnológica de ácido láctido: estado del arte. Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 5, número 1. pp. 54-65, 2005
- (30) J. Zeikus, M. Jain y P. Elangovan. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. Appl. Microbial Biotechnol, vol. 51, p. 545, 1999.
- (31) Caixia Wang, Qiang Li, Dan Wang Jianmin Xing. Caixia Wang, Qiang Li, Dan Wang Jianmin Xing. Improving the lactic acid production of *Actinobacillus succinogenes* by using a novel fermentation and separation integration system. Process Biochemistry 2014 49 (), 1245-1250
- (32) Li, Q., Wang, D., Song, Z.Y., Zhou, W., Wu, Y., Xing, J.M., Su, Z.G., 2010a. Dual-phase fermentation enables *Actinobacillus succinogenes* 130ZT to be a potential role for high-level lactate production from the bioresource. Bioresour. Technol. 101, 7665–7667
- (33) Schindler BD, Joshi RV, Vieille C. Respiratory glycerol metabolism of *Actinobacillus succinogenes* 130 Z for succinate production. J. Inc. Microbiol. Biotechnol., 2014 Sep; 41(9): 1339-52.
- (34) Rhie MN, Yoon HE, Oh HY, Zedler S, Uden G, Kim OB. A Na⁺-coupled C4-dicarboxylate transporter (Asuc_0304) and aerobic growth of *Actinobacillus succinogenes* on C4-dicarboxylates.
- (35) E. D. Gutiérrez López, F. Mejía Cárdenas, C. Pelayo Ortiz, V. González Álvarez, R. I. Corona González, M. P. Ríos Gutiérrez. Producción de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes* ZT-130 y *Providencia* sp. con diferentes fuentes de carbono y desechos agroindustriales. Guadalajara, Jalisco.
- (36) Pailin Boontawan. Development of lactic acid production process from cassava by using lactic acid bacteria. Suranaree University of Technology. 2010.

- (37) Caixia Wan, Yebo Li, Abolghasem Shahbazi, Shuangning Xiu. Succinic Acid Production from Cheese Whey using *Actinobacillus Succinogenes* 130Z. Humana. Press Inc. 2007.
- (38) Joanna Martha González Saltos. Elaboración y evaluación nutricional de una bebida proteica a base de lactosuero y chocho (*Lupinus mutabilis*) como suplemento alimenticio. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2011.
- (39) Marina Manuela Loureiro Pinto. Obtención bioquímica de 1,3-propanodiol a partir de glicerina. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. 2009.
- (40) Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
<http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM_22257.html>
(06/06/2015)
- (41) Ruzin, Buffers. Plant Microtechnique and Microscopy. 1999.
- (42) Zhu LW, Wang CC, Liu RS, Li HM, Wang DJ, Tang YJ. *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 fermentation medium optimization for the production of succinic acid by response surface methodology. J. Biomed. Biotechnol. 2012: 626137 (2012)
- (43) R. H. Petrucci, W. S. Harwood & F. G. Herring. Química General, 8va Edición. Ed. Prentice Hall.
- (44) McKinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a Chemically Defined Growth Medium. Appl. Environ. Microbiol. 71(11):6651-6656.
- (45) Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus*. Sp. 130 Z. Arch. Microbiol. 1997; 168:332-42.
- (46) P.C. Lee, W. G. Lee, S. Kwon, S.Y. Lee, H. N. Chang. Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. Appl Microbiol Biotechnol 54:23-27. 2000.

Anexos

ANEXO I

Ensayos

1. Ensayos en Penicilin flasks

1.1. Ensayos con glucosa

ENSAYO 1.1.1.

- Sustrato: glucosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	1,25	23,71	0,00	0,64	0,00	0,32	0,62	0,00
96	0,41	23,13	0,00	0,68	0,00	0,34	0,66	0,03

Tabla 33. Resultados Ensayo 1.1.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.1.2.

- Sustrato: glucosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	1,34	29,46	0,00	0,62	0,10	0,00	0,22	0,13
168	0,91	20,20	0,00	6,83	0,11	0,00	0,76	2,25

Tabla 34. Resultados Ensayo 1.1.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.1.3.

- Sustrato: glucosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	1,10	28,70	0,00	0,82	0,13	0,00	0,16	0,10
168	0,87	20,34	0,00	6,51	0,15	0,00	0,35	2,13

Tabla 35. Resultados Ensayo 1.1.3. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.1.4.

- Sustrato: glucosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
8,00	1,29	11,75	6,97	0,37	0,00	0,00	0,43	0,00
24,50	1,42	11,50	7,61	0,82	0,00	0,00	0,64	0,00
47,50	1,07	9,44	6,88	5,39	0,00	0,00	0,64	0,00
75,50	1,01	8,09	6,38	7,81	0,00	0,00	0,61	0,00
99,75	1,02	7,92	6,41	8,63	0,00	0,00	0,62	0,00
162,30	1,05	7,85	6,48	9,14	0,00	0,00	0,63	0,00

Tabla 36. Resultados Ensayo 1.1.4. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.1.5.

- Sustrato: glucosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
8,00	1,47	12,33	7,44	0,63	0,00	0,00	0,71	0,00
24,50	0,94	10,79	6,94	5,37	0,00	0,19	0,72	0,00
47,50	0,63	8,92	6,28	9,00	0,00	0,19	0,69	0,00
75,50	0,57	8,51	6,02	9,29	0,00	0,19	0,67	0,00
99,75	0,58	8,62	6,10	9,42	0,00	0,19	0,68	0,00
162,30	0,61	8,78	6,26	9,65	0,00	0,20	0,70	0,00

Tabla 37. Resultados Ensayo 1.1.5. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

1.2. Ensayos con lactosa

ENSAYO 1.2.1.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, sin flujo de CO₂
- No adición de Na₂CO₃
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
120	18,74	0,38	1,90	0,00	1,24	0,33	0,70	0,00

Tabla 38. Resultados Ensayo 1.2.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.2.2.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- No adición de Na₂CO₃
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
120	11,15	5,59	8,53	0,00	2,32	0,96	1,71	0,00

Tabla 39. Resultados Ensayo 1.2.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.2.3.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 1 g/L
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
120	15,96	5,40	3,36	0,00	4,07	1,31	2,56	0,00

Tabla 40. Resultados Ensayo 1.2.3. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.2.4.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
72	29,00	0,06	0,46	0,00	2,07	0,13	1,23	0,00
96	28,85	0,04	0,46	0,00	2,50	0,15	1,23	0,00
120	28,77	0,00	0,00	0,00	4,08	0,22	1,32	0,00
144	28,03	0,00	0,00	0,00	4,25	0,23	1,51	0,00
168	27,37	0,00	0,00	0,00	4,75	0,36	1,38	0,48
240	24,34	0,00	0,00	0,00	4,85	0,35	1,46	0,45
264	23,44	0,00	0,00	0,00	4,85	0,36	1,59	0,48
288	23,02	0,00	0,00	0,00	4,95	0,35	1,58	0,47
312	22,03	0,00	0,00	0,00	4,98	0,27	1,68	0,60
336	21,97	0,00	0,00	0,00	5,10	0,34	2,00	0,80
408	21,24	0,00	0,00	0,00	5,12	0,36	2,04	0,93
432	20,99	0,00	0,00	0,00	5,13	0,35	2,04	0,95

Tabla 41. Resultados Ensayo 1.2.4. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.2.5.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M.

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
8,00	11,62	0,30	3,44	0,77	0,00	0,60	0,00	0,00
24,50	10,45	0,06	3,51	3,03	0,00	0,63	0,18	0,00
47,50	9,41	0,09	3,32	3,95	0,00	0,65	0,18	0,00
75,50	9,03	0,09	3,51	3,98	0,00	0,65	0,18	0,00
99,75	9,08	0,08	3,49	5,64	0,00	0,64	0,18	0,00
162,30	8,27	0,08	3,44	7,58	0,00	0,65	0,19	0,00

Tabla 42. Resultados Ensayo 1.2.5. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.2.6.

- Sustrato: lactosa (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
8,00	11,30	0,05	3,70	0,74	0,00	0,31	0,10	0,00
24,50	8,52	0,12	3,73	5,07	0,00	0,70	0,16	0,00
47,50	5,76	0,09	3,32	7,58	0,00	0,73	0,18	0,00
75,5	5,41	0,10	3,74	7,53	0,00	0,73	0,17	0,00
99,75	5,12	0,00	3,46	7,88	0,00	0,72	0,16	0,00
162,30	4,97	0,00	3,39	8,78	0,00	0,72	0,18	0,00

Tabla 43. Resultados Ensayo 1.2.6. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

1.3. Ensayos con mezcla de glucosa y lactosa (co-fermentación)

ENSAYO 1.3.1.

- Sustrato: glucosa (15 g/L) y lactosa (15 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	12,84	13,50	0,00	0,65	0,00	0,10	0,43	0,00
96	12,40	12,36	0,00	0,66	0,00	0,10	0,43	0,00

Tabla 44. Resultados Ensayo 1.3.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.3.2.

- Sustrato: glucosa (15 g/L) y lactosa (15 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	13,80	16,38	0,00	2,89	0,08	0,00	0,27	0,95
168	11,40	5,73	0,00	10,53	0,14	0,00	0,39	3,98

Tabla 45. Resultados Ensayo 1.3.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.3.3.

- Sustrato: glucosa (15 g/L) y lactosa (15 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	15,37	15,85	0,00	5,7	0,07	0,00	0,19	0,06
168	13,93	5,31	0,00	9,2	0,08	0,00	0,23	0,21

Tabla 46. Resultados Ensayo 1.3.3. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

1.4. Ensayos con glicerol

ENSAYO 1.4.1.

- Sustrato: glicerol (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Glicerol g/L	Ácido láctico g/L	Ácido succínico g/L	Ácido fórmico g/L	Ácido acético g/L	Etanol g/L
8,00	25,46	2,27	0,00	0,00	0,22	0,00
24,50	24,82	4,15	0,00	0,00	0,28	0,00
47,50	24,65	4,53	0,00	0,00	0,28	0,00
75,50	23,44	4,78	0,00	0,00	0,36	0,00
99,75	23,41	7,33	0,00	0,00	0,41	0,00
162,30	22,16	7,60	0,00	0,00	0,43	0,00

Tabla 47. Resultados Ensayo 1.4.1.

ENSAYO 1.4.2.

- Sustrato: glicerol (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄

Horas	Glicerol g/L	Ácido láctico g/L	Ácido succínico g/L	Ácido fórmico g/L	Ácido acético g/L	Etanol g/L
8,00	28,70	2,24	0,00	0,00	0,17	0,00
24,50	25,38	4,61	0,00	0,00	0,17	0,00
47,50	23,85	5,13	0,00	0,00	0,19	0,00
75,50	23,32	6,07	0,00	0,00	0,20	0,00
99,75	23,23	9,20	0,00	0,00	0,24	0,00
162,30	22,64	10,67	0,14	0,00	0,22	0,00

Tabla 48. Resultados Ensayo 1.4.2.

1.5. Ensayos con manitol

ENSAYO 1.5.1.

- Sustrato: manitol (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Manitol g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
24	30,17	1,41	3,57	1,04	1,78	0,42
96	27,57	1,44	3,58	1,07	1,79	0,50

Tabla 49. Resultados Ensayo 1.5.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.5.2.

- Sustrato: manitol (30 g/L)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄

Horas	Manitol g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
24	28,86	0,98	7,05	0,84	2,04	0,00
96	23,96	1,05	7,76	1,02	2,96	0,00

Tabla 50. Resultados Ensayo 1.5.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

1.6. Ensayos con suero lácteo

ENSAYO 1.6.1.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- No adición de buffer

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	28,50	2,73	0,00	0,83	0,00	0,09	0,80	0,08
96	24,90	3,57	0,00	0,85	0,00	0,10	0,81	0,11

Tabla 51. Resultados Ensayo 1.6.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.6.2.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na_2CO_3
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	14,43	2,48	0,00	10,13	0,33	0,00	0,99	3,92
168	12,76	2,60	0,00	10,87	0,33	0,00	1,00	4,16

Tabla 52. Resultados Ensayo 1.6.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.6.3.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: aerobias
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	19,24	1,53	0,00	9,15	0,34	0,00	0,86	3,11
168	18,79	1,82	0,00	9,41	0,35	0,00	0,87	3,18

Tabla 53. Resultados Ensayo 1.6.3. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.6.4.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, sin flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- No adición de buffer.

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	15,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,33	2,38
192	8,80	5,07	0,36	0,00	0,14	1,06	3,42	3,86

Tabla 54. Resultados Ensayo 1.6.4. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.6.5.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 2 g/L
- No adición de buffer.

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	27,4	0,00	0,22	0,00	0,17	0,60	2,95	2,13
192	23,7	2,98	1,00	0,00	0,37	2,70	3,56	2,60

Tabla 55. Resultados Ensayo 1.6.5. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYOS 1.6.6.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, sin flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 10 g/L
- No adición de buffer.

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	28,87	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,27	1,09
192	25,99	1,13	0,55	0,00	0,15	0,00	0,34	1,41

Tabla 56. Resultados Ensayo 1.6.6. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

ENSAYO 1.6.7.

- Sustrato: suero lácteo (30 g/L lactosa)
- Operación: incubador orbital
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 10 g/L
- No adición de buffer.

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
48	30,23	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,68	0,69
192	28,70	0,30	0,67	0,00	0,45	0,28	1,07	0,86

Tabla 57. Resultados Ensayo 1.6.7. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

2. Ensayos en biorreactor

2.1. Ensayos con lactosa

ENSAYO 2.1.1.

- Sustrato: lactosa (40 g/L)
- Operación: biorreactor
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de NaHCO₃: 5 g/L
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M
- Cepa de morfología anaerobia
- Modificación: 0,5 g/L MgCl₂·6H₂O (en lugar de 0,2 g/L MaCl₂·6H₂O)

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
0	32,10	0,00	0,64	0,51	0,32	0,00	0,00	0,00
2,69	31,94	0,00	0,51	0,51	0,33	0,18	0,23	0,00
20,07	31,48	0,00	0,51	0,52	0,89	0,31	0,48	0,00
26,16	31,36	0,00	0,52	0,53	1,10	0,34	0,51	0,00
44,56	30,58	0,00	0,53	0,55	1,68	0,38	0,58	0,00
75,38	30,46	0,00	0,55	0,55	2,89	0,45	0,71	0,00
93,03	30,36	0,00	0,55	0,62	3,61	0,48	0,80	0,00
139,73	30,16	0,00	0,62	0,65	4,84	0,49	0,97	0,00
168,14	30,10	0,00	0,68	0,64	5,45	0,52	1,08	0,00
187,03	30,09	0,00	0,65	0,68	5,46	0,51	1,18	0,00

Tabla 58. Resultados Ensayo 2.1.1. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

Horas	Absorbancia	Biomasa seca (g/L)
0	0,107	0,405
2,69	0,323	1,222
20,07	0,382	1,445
26,16	0,399	1,510
44,56	0,421	1,593
75,38	0,354	1,339
93,03	0,313	1,184
139,73	0,311	1,177
168,14	0,310	1,173
187,03	0,313	1,184

Tabla 59. Evolución de la biomasa en el Ensayo 2.1.1.

ENSAYO 2.1.2.

- Sustrato: lactosa (40 g/L)
- Operación: biorreactor
- Condiciones: anaerobias, con flujo de CO₂
- Adición de NaHCO₃: 10 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄
- Cepa de morfología anaerobia
- Modificaciones: 0,5 g/L MgCl₂·6H₂O (en lugar de 0,02 g/L MgCl₂·6H₂O) y 0,2 g/L CaCl₂·H₂O (en lugar de 0,02 g/L CaCl₂·H₂O)

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
0	35,55	0,09	0,38	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00
6,48	34,49	0,00	0,34	1,11	0,00	1,08	0,99	0,00
22,37	26,90	0,78	2,27	1,48	2,49	2,63	3,16	0,00
31,84	7,30	0,49	3,86	2,29	12,65	4,74	6,57	0,00
53,2	0,00	0,13	0,65	4,72	22,15	5,52	9,47	2,75
80,06	0,00	0,10	0,00	4,77	23,83	5,64	10,19	3,76
118,58	0,00	0,09	0,00	4,38	23,61	5,18	10,27	4,51
142,75	0,00	0,10	0,00	4,09	25,78	5,21	11,27	5,33
214,79	0,00	0,10	0,00	2,01	28,76	5,15	13,89	6,41

Tabla 60. Resultados Ensayo 2.1.2. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

Horas	Absorbancia	Biomasa seca (g/L)
0	0,178	0,673
6,48	0,729	2,758
22,37	0,814	3,080
31,84	0,841	3,182
53,2	0,824	3,118
80,06	0,81	3,065
118,58	0,783	2,962
142,75	0,773	2,925
214,79	0,781	2,955

Tabla 61. Evolución de la biomasa en el Ensayo 2.1.2.

ENSAYO 2.1.3.

- Sustrato: lactosa (40 g/L)
- Operación: biorreactor
- Condiciones: aerobias
- No adición de Na₂CO₃
- Adición de buffer: cacodilato sódico 0,05 M
- Cepa de morfología aerobia

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
0	37,41	0,95	0,61	0,04	0,00	0,89	0,93	0,00
2,56	36,84	1,15	1,71	0,51	0,00	1,03	1,91	0,06
5,62	36,76	0,97	0,63	1,08	0,00	1,28	2,46	0,38
19,36	35,71	1,22	0,87	2,17	0,00	1,23	3,11	0,29
25,57	35,02	1,28	0,88	3,60	0,00	2,78	3,28	0,31
42,78	34,81	1,47	1,31	4,06	0,00	2,94	3,39	0,89
53,57	34,99	1,20	1,65	4,30	0,00	3,15	3,47	1,11
78,06	28,12	0,88	1,84	4,66	0,00	3,32	3,33	1,45
93,25	27,37	0,81	2,41	5,36	0,00	3,50	3,63	2,00

Tabla 62. Resultados Ensayo 2.1.3. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

Horas	Absorbancia	Biomasa seca (g/L)
0	0,064	0,242
2,56	0,190	0,719
5,62	0,381	1,442
19,36	0,440	1,665
25,57	0,470	1,778
42,78	0,530	2,005
53,57	0,673	2,546
78,06	0,710	2,686
93,25	0,677	2,561

Tabla 63. Evolución de la biomasa en el Ensayo 2.1.3.

ENSAYO 2.1.4.

- Sustrato: lactosa (40 g/L)
- Operación: biorreactor
- Condiciones: doble período, 20 horas en aerobio y el resto en anaerobio con CO₂
- Adición de Na₂CO₃: 1 g/L
- Adición de buffer: 3 g de KH₂PO₄ y 1,5 g de K₂HPO₄
- Cepa de morfología aerobia

Horas	Lactosa g/L	Glucosa g/L	Galactosa g/L	AL g/L	AS g/L	AF g/L	AA g/L	Etanol g/L
0	37,55	0,09	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
2,62	37,07	0,40	0,00	0,87	0,00	0,00	0,07	0,00
7,12	37,28	0,08	0,00	1,66	0,00	0,17	0,10	0,00
27,18	32,91	0,08	0,05	5,05	0,75	0,26	0,14	0,00
51,31	25,39	0,05	0,49	14,50	0,93	0,74	0,54	0,00
74,89	21,59	0,06	0,71	21,06	1,07	0,82	0,66	0,00
99,30	19,66	0,07	0,82	24,11	1,16	0,86	0,75	0,00
125,33	19,45	0,08	0,77	25,56	1,21	0,88	0,78	0,00
150,36	19,50	0,06	0,71	26,17	1,22	0,94	0,84	0,00

Tabla 64. Resultados Ensayo 2.1.4. AL, ácido láctico; AS, ácido succínico; AF, ácido fórmico; AA, ácido acético.

Horas	Absorbancia	Biomasa seca (g/L)
0	0,213	0,806
2,62	0,480	1,816
7,12	0,483	1,827
27,18	0,718	2,717
51,31	0,680	2,573
74,89	0,654	2,474
99,30	0,435	1,646
125,33	0,234	0,885
150,36	0,268	1,014
262,45	0,253	0,957

Tabla 65. Evolución de la biomasa en el Ensayo 2.1.4.



ANEXO II

Cálculo de parámetros de fermentación

Productividad

$$Prod. = \frac{P}{t}$$

Prod.: productividad [=] $g/L \cdot h$

P: concentración de producto tras un tiempo *t* [=] g/L

t: tiempo [=] h

Rendimiento de producto

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

$Y_{P/S}$: rendimiento producto-sustrato [=] g/g

$\Delta P = (\text{Concentración producto final} - \text{Concentración producto inicial})$ [=] g/L

$\Delta S = (\text{Concentración sustrato inicial} - \text{Concentración sustrato final})$ [=] g/L

Rendimiento de biomasa

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$Y_{X/S}$: rendimiento biomasa-sustrato [=] g/g

$\Delta X = (\text{Concentración biomasa final} - \text{Concentración biomasa inicial})$ [=] g/L

$\Delta S = (\text{Concentración sustrato inicial} - \text{Concentración sustrato final})$ [=] g/L

Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{d \ln X}{dt}$$

μ : velocidad específica de crecimiento [=] h^{-1}

t: tiempo [=] h

Los cálculos se encuentran en el archivo Excel "Anexo II".

