



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Producción de biobutanol a partir de subproductos
de industria agroalimentaria. Análisis de estrategias
en operación en continuo**

Autor:

Pablos de la Fuente, Cristian

Tutor:

García Cubero, María Teresa

Cotutor:

González Benito, Gerardo

**Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente
Valladolid, Septiembre de 2015.**

Resumen - Abstract

Resumen - Abstract

Resumen

Se ha estudiado la viabilidad de la operación en continuo de la fermentación ABE utilizando sacarosa como sustrato. Se han empleado dos biorreactores colocados en serie, tratando así de imitar las fases de crecimiento en discontinuo llevadas a cabo por la bacteria *Clostridium beijerinckii* DSM 6422. Para ello primeramente se han llevado a cabo una serie de experimentos en discontinuo a partir de los cuales se ha encontrado la concentración de sustrato más conveniente, y los parámetros necesarios para un posterior dimensionado de la planta piloto en continuo. En dicha planta finalmente se han efectuado varios experimentos empleando diversas estrategias de arranque hasta alcanzar la que se ha considerado como más conveniente. Como resultados se ha obtenido una concentración final de butanol en régimen estacionario de 1,01 g/l, y de 0,35 g/l de acetona utilizando una concentración de sacarosa de 30 g/l tras 250 horas de experimentación.

Palabras clave: fermentación ABE, sacarosa, butanol, *Clostridium beijerinckii*, continuo.

Abstract

The viability of continuous ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 is described. Two bioreactors in series have been used in order to simulate the two phases of batch culture growth using sucrose as substrate. Firstly some batch experiments have been carried on to look for the best substrate concentration and the necessary parameters for the purpose of designing a continuous pilot plant. Then some continuous experiments were carried on using a few start strategies to try to come across the best one. As a result a final concentration of 1,01 g/l of butanol and 0,35 g/l of acetone has been found using a 30 g/l concentration of sucrose as substrate for a period of continuous operation of 250 hours. A growth rate close to its maximal value has been use in the first reactor where acidogenesis were developed.

Keywords: ABE fermentation, sucrose, butanol, *Clostridium beijerinckii*, continuous.

Índice

Índice

Índice

1. Introducción.....	2
1.1 Introducción.....	4
1.2 Microorganismos.....	5
1.3 Materia Prima.....	6
1.4 Ruta metabólica.....	7
1.4.1 Acidogénesis.....	9
1.4.2 Solventogénesis.....	9
1.5 Productos.....	11
1.5.1 Acetona.....	12
1.5.2 Butanol.....	13
1.5.3 Etanol.....	15
1.6 Modos de operación.....	16
1.6.1 Fermentación en batch.....	16
1.6.2 Fermentación en fed-batch.....	16
1.6.3 Fermentación en continuo.....	17
1.7 Separación de los Productos.....	19
1.7.1 Destilación.....	19
1.7.2 Stripping.....	20
1.7.3 Adsorción.....	20
1.7.4 Extracción líquido-líquido.....	21
1.7.5 Pertracción.....	22
1.7.6 Ósmosis inversa.....	22
1.7.7 Destilación en membrana.....	23
1.7.8 Pervaporación.....	24
2. Objetivos.....	26
3. Materiales y métodos.....	30
3.1 Microorganismo utilizado y condiciones de cultivo.....	32
3.1.1 Microorganismo.....	32
3.1.2 Mantenimiento y formación del inóculo.....	32
3.1.3 Medio de fermentación.....	33
3.2 Sustrato.....	34
3.3 Experimentación con biorreactores.....	34

Índice

3.3.1 Experimentación en batch	34
3.3.2 Experimentación con 2 biorreactores en continuo.....	35
3.4 Métodos analíticos	36
3.4.1 Determinación de azúcares, ácidos y solventes.....	36
3.4.2 Medida de la biomasa	36
3.4.3 Observación microscópica de los cultivos.....	36
4. Resultados	37
4.1 Experimentación en discontinuo.....	39
4.1.1 Concentración de sustrato de 60 g/L	39
4.1.2 Concentración de sustrato de 30 g/L	44
4.1.3 Comparación en función de la concentración de sustrato	46
4.1.4 Determinación de parámetros biológicos y cinéticos	47
4.1.5 Velocidad de crecimiento máxima	48
4.2 Operación en continuo.....	51
4.2.1 Dimensionado de los biorreactores	51
4.2.2 Construcción y puesta a punto de la planta.....	52
4.2.3 Modo de operación	53
4.2.4 Arranque.....	54
4.2.5 Resultados	55
5. Conclusiones.....	85
6. Bibliografía	89
ANEXO I	95
1. Experimentación en discontinuo.....	97
Experimento 1.1	97
Experimento 1.2	98
2. Experimentación en continuo	99
Experimento 2.1	99
Experimento 2.2	101
Experimento 2.3	103
Experimento 2.4	106

1. Introducción

1. Introducción

1.1 Introducción

La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) es una de las fermentaciones industriales de las que más antiguamente se tienen conocimientos, ya que fue descubierta en 1861 por Louis Pasteur. No obstante Pasteur únicamente detectó la presencia de butanol tras la fermentación, y no fue hasta años más tarde, concretamente en 1905 cuando Schardinger dio cuenta de la presencia de acetona (1).

Entre 1912 y 1914 Chaim Weizmann consiguió aislar cepas de *Clostridium acetobutylicum*, las cuales tenían la habilidad de fermentar sustratos de almidón y conseguir unos rendimientos de butanol superiores a lo anteriormente existente (1).

Ya en la Primera y Segunda Guerra Mundial se produce un gran crecimiento de la industria de la fermentación ABE tanto en Estados Unidos como en Europa, debido a la aplicación de los productos mayoritarios de la misma para fines bélicos. A partir del año 1945 se comienza la implantación de este tipo de industria en países como China, Japón, Sudáfrica o la antigua unión soviética (1).

Sin embargo, al finalizar la Segunda Guerra Mundial comienza a florecer la industria petroquímica a una velocidad sin precedentes, este hecho hace que se abandonara el proceso de fermentación ABE, debido a que butanol y acetona son dos productos que se pueden obtener en grandes cantidades de una manera mucho más barata mediante síntesis química (1).

De esta manera en 1960 prácticamente todas las industrias que utilizaban la fermentación ABE para obtener acetona y butanol se encuentran cerradas, y únicamente en paises como China Sudáfrica o Rusia se continua realizando este tipo de fermentaciones debido a la abundancia y bajo precio de melazas como sustrato (1).

Hoy en día sin embargo, debido principalmente a la cada vez menor cantidad de combustibles fósiles, su alto precio y a la preocupación creciente por el calentamiento global, la industria de la fermentación ABE está volviendo a imponerse con fuerza como posible sustitución a largo plazo de la industria petroquímica para la obtención de butanol y acetona, impulsada además por los nuevos conocimientos que se poseen sobre ingeniería genética y que permiten la modificación de cepas de microorganismos de manera que se consigue obtener una mayor cantidad de producto a un precio muy inferior al de otras épocas (2).

El reciente interés en esta fermentación también es debido a que el butanol tiene una densidad energética cercana a la gasolina (29 MJ/L) y bastante por

1. Introducción

encima de la que posee el etanol (16 MJ/L) (3), es un compuesto menos volátil, menos higroscópico, y menos corrosivo que este último, de tal manera que lo hace mucho más interesante a la hora de utilizarlo como combustible en los motores existentes (4).

1.2 Microorganismos

La producción de acetona, butanol y etanol es llevada a cabo principalmente por bacterias, concretamente por aquellas que pertenecen al género *Clostridium* (1). Existe un elevado número de especies diferentes dentro del género *Clostridium* que son capaces de realizar la fermentación ABE, y que se pueden diferenciar según el ratio de disolventes producidos (1).

La bacteria *Clostridium acetibutylicum*, es la más usada para realizar este tipo de fermentaciones (5) (1) (6); la mayor parte del conocimiento obtenido de este tipo de fermentación ha sido recogido utilizando esta bacteria, y si bien esto ha permitido avanzar relativamente rápido en su estudio, también ha provocado que los resultados obtenidos se extrapolen para otras especies cuando eso no es del todo correcto. El ratio (A:B:E) de disolventes obtenidos por esta especie es de 75:10:15 (6).

Otra especie capaz de llevar a cabo este tipo de fermentación es *Clostridium beijerinckii*. Esta especie destaca por tener diferentes variantes. Dependiendo de la especie concreta de *C. beijerinckii* que se esté utilizando se pueden obtener diversos productos y ratios de los mismos. Por ejemplo, como productos se pueden obtener butanol, etanol y en lugar de acetona, esta se transforma en isopropanol (5). Esto es especialmente interesante para la producción de biodiesel, ya que la acetona no puede ser utilizada como combustible, pero el isopropanol sí. Otra variante existente es aquella que no produce isopropanol (5), dando ratios muy similares a aquellos obtenidos por *C. acetibutylicum* (1). Por último existe una última variante de esta especie que es capaz de producir butanol, etanol y una mezcla de acetona e isopropanol (5).

También dentro del género *Clostridium*, *Clostridium tentanomorphum* es capaz de producir únicamente butanol y etanol en ratios 1:1 (5), y *Clostridium thermosaccharolyticum*, es caracterizada por ser termófila y porque también produce etanol y butanol en ratios aproximadamente iguales (5).

Todos estos microorganismos forman esporas, son anaerobios y tienen requisitos de crecimiento relativamente simples (1). Estas bacterias se han encontrado principalmente asociadas a materiales vegetales vivos, como son

1. Introducción

patatas, raíces de legumbres fijadoras de nitrógeno y otras raíces de cultivos (1), además de cereales, frutas como las grosellas o suelo agrícola.

Por otro lado algunas especies del género *Bacillus* también pueden utilizarse para la formación de acetona y alcoholes mediante fermentación, destacando *Bacillus saccharobutylicum*, o *Bacillus butacone*, todos ellos formadores de esporas (6).

Existen además otros microorganismos no formadores de esporas que son capaces de generar butanol, pero que sin embargo no son utilizados en la industria debido a diversas razones, como por ejemplo ser patógenos, producir acetona y butanol en muy pequeñas cantidades, producir fermentaciones muy lentas, etc... (6)

Como conclusión debe destacarse que la elección de una u otra especie para uso industrial, dependerá de la naturaleza del sustrato a utilizar, del ratio de productos requerido, así como de la necesidad de nutrientes adicionales y que sea resistente al fago (1).

1.3 Materia Prima

El género *Clostridia* es capaz de utilizar un gran número de azúcares y carbohidratos para realizar la fermentación ABE (7) (4), el coste de la materia prima a emplear en la fermentación ABE, o sustrato, es muchas veces uno de los factores más importantes a la hora de decidir si el proceso es rentable o no (7), por eso el hecho de poder utilizar una amplia gama de sustratos hace tan interesante a esta clase.

A lo largo de los años se han investigado sustratos tales como la glucosa, xilosa, maíz, almidones, melazas, pulpa de manzana, biomasa algal, suero de queso... (4) (1) con diferentes resultados. Sin embargo hoy en día cada vez se investigan más otras materias primas o fuentes de carbohidratos que no son utilizadas como posibles alimentos, sino que se trata de material lignocelulósico procedente de residuos de labores agrícolas en su amplia mayoría (4), con alto contenido en sustratos fermentables, tales como bagazo procedente de la caña de azúcar, paja de trigo, o paja de cebada (7).

De esta manera se pretende abaratar el coste de los sustratos haciendo más rentable la fermentación y además dando la posibilidad de purificar aguas residuales.

Por lo tanto se tienen tres fuentes de carbono principales, capaces de dar buenos resultados en la fermentación ABE: azúcares simples, almidones y material lignocelulósico (7). Dependiendo de cuál sea la naturaleza del

1. Introducción

sustrato se deberán realizar una serie de operaciones de pretratamiento diferentes para cada caso antes de realizarse la fermentación.

La principal diferencia entre los procesos es la necesidad o no de una hidrólisis previa a la fermentación, necesaria en el caso de que se parte de almidón o material lignocelulósico, no siendo así cuando se parte de materias primas como la caña de azúcar cuyos carbohidratos ya son fácilmente fermentables por los microorganismos.

En el caso del almidón además de una sacarificación, es necesaria en algunas ocasiones una etapa de desgerminación o incluso de separación de las proteínas presentes en el material almidonado.

Respecto al material lignocelulósico habrá que tener en cuenta que en muchas ocasiones la hidrólisis puede generar una importante cantidad de componentes inhibitorios para la fermentación, por lo que deberán de ser retirados del proceso (7).

De lo expuesto se deduce que a la hora de seleccionar el sustrato adecuado para realizar la fermentación ABE se debe tener en cuenta tanto el origen como la composición del mismo a la hora de determinar si es rentable o no su utilización. No obstante, una vez tenido en cuenta esto, la utilización de los microorganismos para obtener un producto de valor añadido a partir de residuos parece una elección muy acertada desde todos los puntos de vista.

1.4 Ruta metabólica

La fermentación ABE consta de dos fases diferenciadas la acidogénesis y la solventogénesis (5).

La acidogénesis ocurre en la fase de crecimiento celular. Durante esta etapa los microorganismos generan y expulsan al medio ácido acético y ácido butírico, además de hidrógeno y dióxido de carbono como principales productos. El incremento en la concentración de ácidos en el medio provoca un descenso importante del pH respecto al inicial (1).

Una vez que se llega aproximadamente a la fase de crecimiento celular estacionario finaliza la acidogénesis y comienza la solventogénesis. En esta segunda etapa tiene lugar una reasimilación de los ácidos producidos en la primera, sin que esto signifique que se cese el consumo de carbohidratos. Debido a que la concentración de ácidos disminuye, como resultado de esta etapa se da un incremento en el pH del medio de fermentación y se obtienen los productos finales de la fermentación ABE: acetona, butanol y etanol (1).

1. Introducción

En la figura 1 se muestra la ruta metabólica de la bacteria *Clostridium beijerinckii*, uno de los microorganismos más utilizados para la fermentación ABE (1):

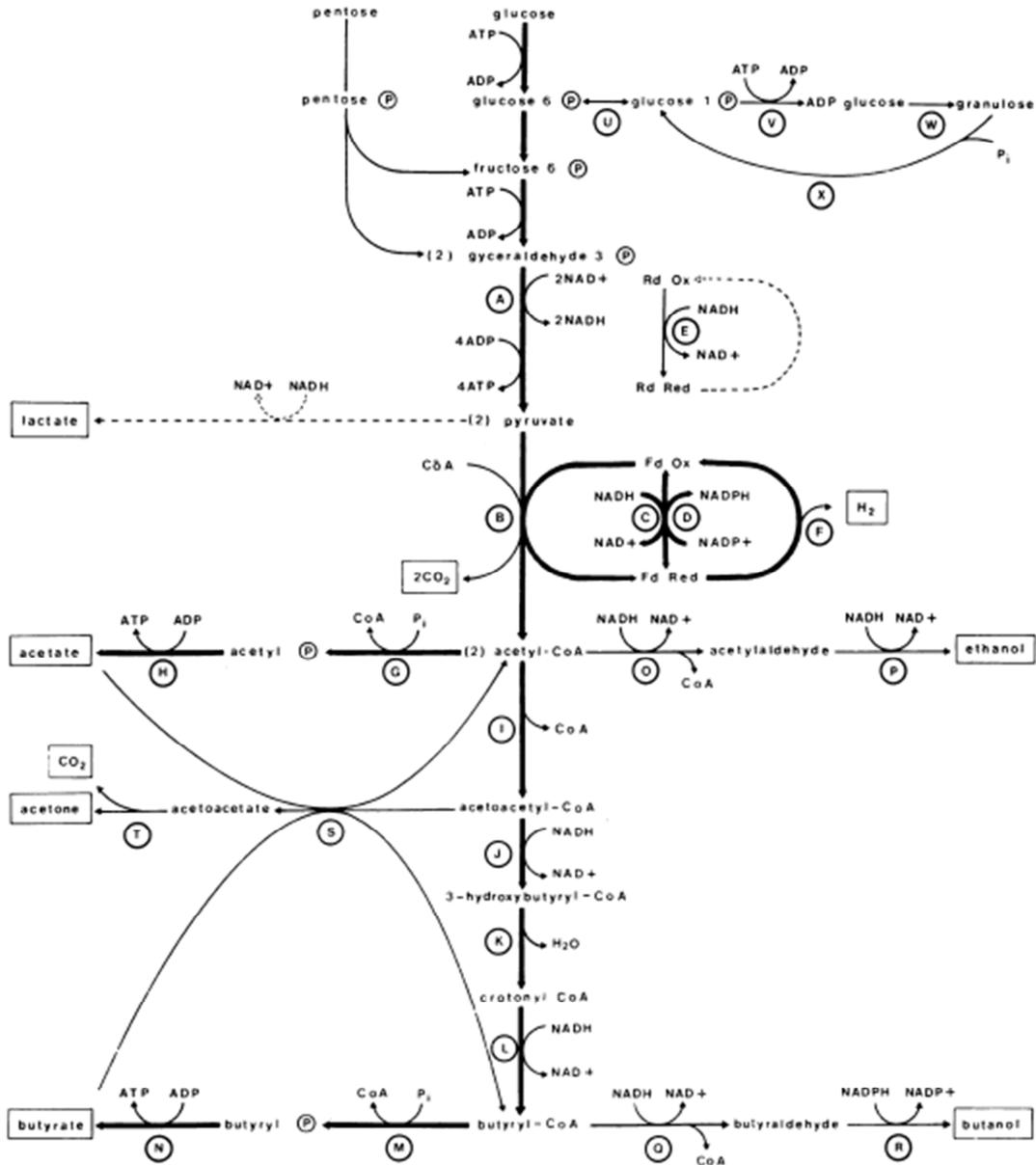


Figura 1. Ruta metabólica de *Clostridium Beijerinckii*

Las hexosas son metabolizadas vía la ruta metabólica de Embden-Meyerhof con la conversión de 1 mol de hexosa a 2 moles de piruvato, con una producción neta de 2 moles de ATP (adenosín trifosfato) y 2 moles de NADH (nicotinamida adenina dinucleotido) (1).

1. Introducción

Además de hexosas, el género clostridia puede metabolizar también pentosas por la ruta metabólica pentosa fosfato. Como resultado de esta ruta se obtienen por cada 3 moles de pentosa 5 moles de ATP y 5 moles de NADH (1).

A continuación se explican más detalladamente las dos etapas que se dan en la fermentación ABE, centrándose especialmente en la solventogénesis, ya que es donde se obtienen los productos deseados de fermentación y una buena comprensión de esta etapa es crucial para obtener los mayores rendimientos de producto posibles.

1.4.1 Acidogénesis

En esta primera fase, el flujo de carbono está destinado a la producción de diferentes tipos de ácidos. Por un lado está el ácido butírico y el ácido acético, y por otro lado cabe la posibilidad de que *Clostridium Beijerinckii* pueda convertir el piruvato en lugar de Acetil-Coa en lactato (1), pero esta ruta metabólica solamente es empleada por la bacteria cuando se encuentra ante condiciones muy desfavorables (1), como puede ser la presencia de monóxido de carbono (8), o el agotamiento del hierro presente en las células (9), y es empleada como una alternativa menos eficiente para la generación de energía y la oxidación del NADH (1).

Centrándose en el butirato y el acetato, ambos ácidos son generados mediante dos etapas a partir de sus predecesores, butiril - CoA y acetil - CoA respectivamente como se puede observar en la figura 1. Las enzimas encargadas de esta transformación son en el caso del ácido butírico la fosfato butiltransferasa (M) y la butirato kinasa posteriormente (N). En el caso del ácido acético son la fosfato acetil transferasa (G) y la acetato kinasa (H) (9).

Sendas rutas están destinadas a la producción de ATP, y es la ruta en la que el acetil - CoA es transformado al butiril - CoA donde se produce la regeneración del NADH. Estos pasos son llevados a cabo mediante cuatro enzimas: thiolasa (I), β -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa (J), crotonasa (K) y butiril-CoA (L) deshidrogenasa (9).

1.4.2 Solventogénesis

El comienzo de la solventogénesis involucra un cambio en el flujo de carbono respecto a la acidogénesis. Ahora se reduce la cantidad de carbono destinado a las rutas de producción de ácidos y comienza a enviarse a rutas productoras de disolventes (9).

1. Introducción

En un comienzo se sugirió que este cambio en el que los ácidos producidos en la primera etapa son reasimilados, podía ocurrir debido a un proceso de detoxificación iniciado por la acumulación de ácidos que resultan ser desfavorables para el crecimiento celular (10).

Estudios realizados posteriormente dieron a conocer que con la adición de ácido acético o ácido butírico se lograban mayores rendimientos en cuanto a la producción de acetona y butanol (9) (11) (12). Además se propuso que durante la producción de disolventes se podía estar dando la ruta metabólica de producción de ácido acético y ácido butírico a la inversa (13).

Finalmente otra serie de estudios ha demostrado que la asimilación de los ácidos producidos durante la primera etapa está directamente relacionado con la producción de acetona por la vía acetoacetyl-CoA: acetato/butirato: CoA transferasa (9). Se ha observado que la Acetoacetyl-CoA transferasa es capaz de utilizar tanto acetato como butirato como aceptores de CoA durante la conversión del acetoacetyl-CoA a acetoacetato (14). En este proceso el acetoacetato producido es entonces descarboxilado en una etapa irreversible para formar acetona y CO₂. Además se ha demostrado (14) que la asimilación de los ácidos se da solamente después de que la acetoacetyl descarboxilasa es inducida, y se ha encontrado que el pH óptimo para esta enzima está alrededor de 5,0, lo que hace que sea posible la producción de acetona con un pH ácido.

Para *C. acetobutylicum* la acetona es un producto final, sin embargo para *C. beijerinckii* en una de sus variantes la acetona es reducida a isopropanol por la acción de la enzima isopropanol deshidrogenasa (9).

Estudios posteriores demostraron que la actividad de las enzimas fosfato butyryl-transferasa (M), fosfato acetiltransferasa (G) y acetato kinasa, rápidamente disminuía una vez que la etapa de solventogénesis había comenzado, por lo tanto este descubrimiento demostró la no validez de las teorías sobre una vía metabólica reversible para la creación de ácidos (10). El 97 % de los moles de ácidos utilizados estaban destinados a la producción de acetona con una desviación estándar de 11, lo que sugiere que el mecanismo de asimilación de ácidos tiene como objetivo la producción de cantidades equimolares de acetoacetato (10).

En resumen, todos estos estudios demostraron que la asimilación de ácidos está relacionada con la formación de acetona y que no se puede dar una asimilación de estos ácidos sin la correspondiente obtención de cantidades equivalentes de la misma. Por lo tanto se podría deducir que no sería posible obtener buenos rendimientos de butanol sin una buena producción de acetona (1).

1. Introducción

Resultados obtenidos por otra serie de estudios (15) demostraron que el ácido butírico rápidamente es reducido a butanol durante la solventogénesis, y que además más del 55% de ácido acético es también convertido a butanol, mientras que la mayor parte restante es utilizada para la formación de acetona y dióxido de carbono, y solo una pequeña parte es destinada a la producción de etanol (9) (15).

En otros experimentos realizados se comprobó que si se adicionaba únicamente ácido acético al medio de fermentación a cultivos en los que existía limitación por glucosa, se mejoraba la producción de disolventes, pero sin embargo no se alteraba la relación acetona/butanol (9). Sin embargo cuando el ácido acético era añadido a cultivos en los que no existía limitación por glucosa, la concentración de acetona incrementaba quedándose inalterada la concentración de butanol (16). El incremento en la concentración de acetona demostró que la acetoacetato descarboxilasa no era un factor limitante en la producción de acetona. Además se observó que bajo condiciones de glucosa ilimitada el exceso de acetyl-CoA generado por el consumo de acetato era desviado a la producción de acetona en lugar de butanol (1). Esto es debido a que el acetyl-CoA generado por el consumo del ácido añadido no está relacionado con la formación de NADH como lo está el generado por la glucólisis. Por lo tanto bajo estas condiciones el exceso de acetyl-CoA es metabolizado para producir un producto oxidado como es la acetona en lugar de reducirse a butanol (1).

Del resultado de estos experimentos se deduce por lo tanto que la formación de acetona no está relacionada necesariamente con la formación de butanol (1).

1.5 Productos

Los productos típicamente obtenidos por este tipo de fermentación, son acetona, butanol y etanol. Normalmente se hallan presentes en el producto en una relación molar 3:6:1 (17). Esta relación convierte al butanol en el producto principal de las fermentaciones ABE, siendo también importante la producción de acetona y en menor parte la producción de etanol, ya que puede ser obtenido con una mayor productividad mediante fermentaciones llevadas a cabo por levaduras. A continuación se exponen las características más relevantes de cada uno de los productos obtenidos, así como usos de los mismos.

1. Introducción

1.5.1 Acetona

La acetona, también conocida como dimetilcetona o 2-propanona, se trata de un compuesto orgánico muy inflamable de la familia de las cetonas que se presenta en condiciones normales como un líquido incoloro de olor característico (18). Se trata de un compuesto químico ampliamente utilizado en la sociedad gracias a sus propiedades como disolvente, siendo también utilizado en la industria ya que es capaz de disolver una gran cantidad de plásticos, pegamentos, así como otros compuestos químicos (19). Es miscible en agua, lo que le hace especialmente útil en tareas de secado ya que posee una alta volatilidad.

Su fórmula química es C_3H_6O , y su estructura es la indicada en la figura 2:

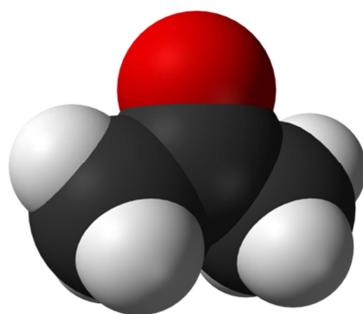


Figura 2. Estructura de la acetona

Como formas de obtención tradicionales encontramos como principal vía la hidrólisis en medio ácido del hidroperóxido de cumeno, y en segundo lugar la deshidrogenación catalítica del alcohol isopropílico (20).

A continuación se muestran algunas de las propiedades físicas más importantes de la acetona (21):

- Punto de ebullición: $56^{\circ}C$
- Punto de fusión: $-95^{\circ}C$
- Densidad relativa (agua = 1): 0,8
- Solubilidad en agua: miscible.
- Presión de vapor, kPa a $20^{\circ}C$: 24
- Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2,0
- Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a $20^{\circ}C$ (aire = 1): 1,2
- Punto de inflamación: $-18^{\circ}C$ c.c.
- Temperatura de autoignición: $465^{\circ}C$
- Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 2,2-13
- Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: -0,24
- Viscosidad, mm^2/s a $40^{\circ}C$: 0,34

1. Introducción

En la vida cotidiana la acetona es utilizada principalmente como quitaesmaltes gracias a sus propiedades disolventes de compuestos orgánicos, destacando también por la capacidad de eliminar restos de pegamentos y epóxidos (19).

En el laboratorio es muy comúnmente utilizada para la limpieza de utensilios ya que es capaz de eliminar restos grasientos y además acelera el proceso de secado de los instrumentos gracias a su alta volatilidad (18).

En la industria, la acetona se utiliza principalmente para la obtención de metil metacrilato (MMA) (22). Este se trata de un líquido claro con olor frutal, utilizado principalmente para la obtención de polimetil metacrilato (PMMA), un laminado utilizado normalmente como sustituto de cristales de seguridad o paneles (23).

Otro uso importante a nivel industrial es la obtención de Bisfenol A (22). Este se trata de un sólido incoloro soluble en disolventes orgánicos, y utilizado principalmente para fabricar plásticos y resinas (24).

Además hay que destacar que se trata de un disolvente ampliamente utilizado en la industria (22), y un aditivo en las gasolinas, ya que gracias al poder disolvente de la misma posibilita la limpieza del motor (19).

1.5.2 Butanol

El butanol se trata de un alcohol primario que se presenta como cuatro posibles isómeros estructurales: n-butanol, isobutanol, 2-butanol y el tert-butanol (25). En la experimentación que nos ocupa, el isómero más abundante es el n-butanol, cuya obtención se trata del objetivo principal del estudio como se comentará en sucesivos apartados. Se trata de un líquido claro, con olor característico, soluble en disolventes orgánicos y algo soluble en agua, obtenido tradicionalmente en la industria a partir del propileno (25).

Su fórmula química es C_4H_9OH , y su estructura es la indicada en la figura 3:

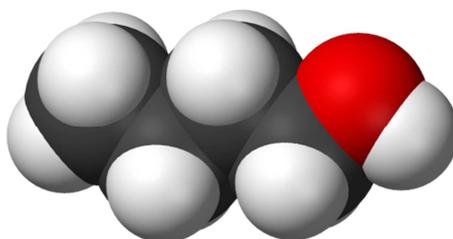


Figura 3. Estructura del butanol

1. Introducción

De entre las propiedades físicas del n-butanol, destacan las siguientes (26):

- Punto de ebullición: 117 °C
- Punto de fusión: -90 °C
- Densidad relativa (agua = 1): 0,81
- Solubilidad en agua, g/100 ml a 20 °C: 7,7
- Presión de vapor, kPa a 20 °C: 0,58
- Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2,6
- Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20 °C (aire = 1): 1,01
- Punto de inflamación: 29 °C (c.c.) Temperatura de autoignición: 345 °C
- Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 1,4-11,3
- Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 0,9

Tradicionalmente en la industria el butanol es utilizado principalmente como intermediario, como por ejemplo para la obtención de butil acrilato, un líquido incoloro con fuerte olor afrutado que se utiliza principalmente en la obtención de fibras sintéticas y en dispersiones de polímeros para fabricar telas, etc... (27)

También se utiliza como producto intermedio para la obtención del butil acetato, dibutil ftalato, así como otros ésteres butílicos, éteres butílicos como el etilenglicol y los correspondientes acetatos de butil éter (25).

Un uso muy importante del butanol es su utilización como disolvente para la obtención de lacas, resinas o barnices además de otros productos como perfumes (25).

Además el butanol también puede ser empleado como combustible sustituyente de la gasolina, gracias a su alto poder calorífico, baja volatilidad y corrosividad (17).

1. Introducción

1.5.3 Etanol

Se trata de un alcohol primario, el cual en condiciones normales se encuentra en estado líquido. Se trata de un compuesto muy volátil, incoloro e inodoro miscible con el agua en cualquier proporción formando una mezcla azeotrópica al 95% de concentración (28).

Su fórmula química es C_2H_5OH , y su estructura es la indicada en la figura 4:

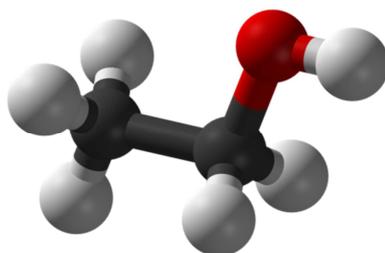


Figura 4. Estructura del etanol

Tradicionalmente ha sido obtenido mediante fermentación anaeróbica gracias a la acción de la levadura *Saccharomyces Cerevisae* sobre los azúcares, de manera que se puede encontrar en muchas bebidas alcohólicas tales como el vino, la cerveza o el aguardiente acompañado de otros compuestos químicos que proporcionan el olor o sabor característico de los mismos. Industrialmente sin embargo el etanol se obtiene principalmente por la hidratación del etileno a etanol (28).

Como propiedades físicas importantes del etanol se pueden destacar las siguientes: (29)

- Punto de ebullición: $79^{\circ}C$
- Punto de fusión: $-117^{\circ}C$
- Densidad relativa (agua = 1): 0,8
- Solubilidad en agua: miscible
- Presión de vapor, kPa a $20^{\circ}C$: 5,8
- Densidad relativa de vapor (aire = 1): 1,6
- Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a $20^{\circ}C$ (aire = 1): 1,03
- Punto de inflamación: $13^{\circ}C$ c.c.
- Temperatura de autoignición: $363^{\circ}C$
- Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 3,3-19
- Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: -0,32

El etanol es utilizado ampliamente en el mundo industrial como disolvente y en la industria farmacéutica como excipiente de diversos productos tales como medicamentos o cosméticos. De manera general es utilizado como anticongelante para vehículos o para la desinfección de heridas, ya que se

1. Introducción

trata de un potente bactericida, siendo especialmente eficaz en mezclas con el agua entorno al 70% (30).

En la industria química es utilizado para la síntesis de productos como el acetato de etilo que se trata de un líquido sin color, inflamable y miscible en agua que se utiliza principalmente como disolvente universal (31), o el éter dietílico, otro disolvente en este caso de compuestos orgánicos, que destaca por ser el primer anestésico que se utilizó en la historia. Se trata de un líquido incoloro con olor característico que es insoluble en agua (32).

Al igual que el butanol, el etanol puede ser utilizado como un combustible alternativo a los tradicionales fósiles. Sin embargo como ya se ha mencionado el etanol es un combustible menos interesante (33) (3).

1.6 Modos de operación

Buena parte del rendimiento de una fermentación ABE reside en la elección del modo de operación mediante el cual se va a llevar a cabo la fermentación. Principalmente existen tres modos de operación, aunque luego se puedan dar diversas variantes dentro de los mismos: batch, fed-batch y continuo. A continuación se analiza cada una de las operaciones presentando además las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas.

1.6.1 Fermentación en batch

Este modo de operación se caracteriza por la ausencia de entradas y salidas del fermentador. Se carga la alimentación junto con el medio de fermentación y se inocula el microorganismo encargado de llevar a cabo la fermentación. Este modo de operación se caracteriza por su alta eficacia, así como por su facilidad de control (17), estas características son las que hacen que pese a que la productividad no sea especialmente elevada sea el modo de operación más empleado en la industria de la fermentación (17).

Sin embargo se encuentra el hecho de que la productividad no sea elevada debido principalmente a los altos tiempos de carga y descarga del reactor, así como a labores de mantenimiento, limpieza y esterilización. Esto hace que se considere una alternativa en procesos en los que el producto tiene un alto valor añadido como por ejemplo la industria farmacéutica (17).

1.6.2 Fermentación en fed-batch

En este modo se opera en un principio de la misma manera que en el caso de la fermentación en batch durante unas 21 h. De esta manera en la fermentación que nos ocupa se permite el comienzo de la solventogénesis. Es entonces cuando se introduce al fermentador alimentación de forma continua durante un determinado tiempo, y posteriormente se vuelve a operar en batch, pudiendo repetir el ciclo de operación cuantas veces se desee.

1. Introducción

Este tipo de técnica de fermentación es empleada sobretodo en casos en los que existe inhibición por sustrato, o se busca la represión catabólica (17) en la que se debe mantener una determinada cantidad de sustrato para impedir la expresión de genes que expresan las proteínas necesarias para la fermentación de otros sustratos y así impedir un gasto energético innecesario (34).

Para el caso de la fermentación ABE esta técnica puede resultar interesante desde el punto de vista de la inhibición por producto, ya que el butanol en altas concentraciones en el caldo de fermentación actúa como bactericida impidiendo un crecimiento celular adecuado, y por lo tanto provocando que la fermentación pueda durar un número de horas más elevado. De esta manera se consigue diluir cada cierto tiempo la concentración de butanol, consiguiendo que se pueda seguir llevando a cabo la fermentación, a expensas por supuesto de diluir la concentración de producto.

Si-Yu Li et al. (17) comprobaron como para la fermentación ABE con control de pH igual a 4,5 y glucosa como sustrato se conseguía sin embargo un mayor rendimiento de producción de disolventes así como una mayor productividad en el caso de fermentación en batch. Diversas posibles causas han sido aportadas por Qureshi et al (35), como pueden ser la presencia de células inactivas o muertas, la acumulación de macromoléculas inhibitorias, y la deficiencia de nutrientes.

1.6.3 Fermentación en continuo

Este tipo de fermentación puede llevarse a cabo utilizando uno o varios reactores colocados en serie (normalmente 2).

Si únicamente se utiliza un fermentador, este modo de operación se caracteriza por operar en un principio de manera discontinua, comenzando posteriormente a alimentar el biorreactor con una determinada velocidad de dilución, sacando además producto de manera que el volumen permanezca constante.

Operando de esta manera se ha encontrado que el rendimiento de producción de disolventes es inferior a la operación en batch, mientras que el rendimiento de producción de butanol es más o menos parejo (17). Respecto a la productividad este modo de operación se presenta como el más atractivo, ya que se evitan los largos periodos de mantenimiento del biorreactor entre carga y carga, y además se reducen los tiempos de esterilización y el tiempo perdido debido a la fase lag en la que las bacterias se acostumbran al medio (17).

Sin embargo varias investigaciones han llegado a la conclusión de que no se puede llevar a cabo una operación en continuo más allá de 2 o 3 semanas en

1. Introducción

un único fermentador, esto es debido a un problema denominado degeneración del disolvente, en el que las bacterias pierden la capacidad de producir los disolventes tras ese periodo de tiempo (17), (36), (37).

Es por ello que una alternativa al uso de un único fermentador es la utilización de 2 fermentadores, de esta manera se ha comprobado que se puede operar durante mucho más tiempo (38), obteniendo un rendimiento de butanol similar al obtenido en una única etapa y una productividad algo menor, pero que puede ser mantenida durante mucho más tiempo (17), y que siempre es superior a la productividad obtenida en el caso de operar en batch o en fed- batch.

Aunque las maneras de realizar la inoculación pueden ser variadas, cuando se opera con dos biorreactores lo que se trata es de simular en el primero de ellos la etapa de acidogénesis y en el segundo la etapa de solventogénesis, de manera que no se pierda la actividad celular consiguiendo que las células puedan seguir produciendo disolventes tras un largo periodo de tiempo de operación (17).

Dentro de los diferentes modos de operación comentados existen multitud de variantes de los mismos en lo que a condiciones de operación se refiere, como puede ser la limitación de algún nutriente, diversas estrategias de alimentación u operar con un pH constante o no entre otras muchas.

Respecto a operar con un pH constante se ha demostrado que el pH óptimo de operación es 4,5 (17) y que los rendimientos son superiores a cuando no se opera controlando el mismo (17). Sin embargo habrá que tener en cuenta desde un punto de vista industrial que si se pretende controlar el pH habrá que invertir en los correspondientes ácidos y bases para mantenerlo constante y habrá que tenerlos en cuenta luego a la hora de diseñar las etapas de separación.

Respecto a las estrategias de alimentación habrá que tener en cuenta que por supuesto cuanto mayor es la velocidad de dilución se obtendrá en principio una mayor productividad operando en continuo en dos etapas salvo que se supere la velocidad a la que se produce el lavado del reactor.

Esto es especialmente verdad en el caso en el que se opera con dos fermentadores, ya que si únicamente se opera con una mayor velocidad de dilución provocará un aumento en la concentración de ácidos en el biorreactor, ya que no se dará tiempo a que las bacterias presentes en el mismo lleguen hasta la solventogénesis (17), por lo tanto encontramos como menores velocidades de dilución hacen que se obtenga una mayor productividad en este caso.

1.7 Separación de los Productos

El caldo obtenido tras el proceso de fermentación ABE contiene normalmente, como ya se ha indicado, un ratio de acetona:butanol:etanol de 3:6:1, con un contenido de butanol de entre 1 y 2% en masa (39), lo que supone una concentración muy pequeña de los principales productos de la fermentación y delimita en muchas ocasiones la viabilidad económica del proceso. Además de los productos anteriormente mencionados, el caldo obtenido de la fermentación contiene ácido acético, ácido butírico, células, nutrientes, agua y sustrato que no haya reaccionado en diferentes concentraciones.

Las diferentes técnicas de separación existentes hasta la fecha se centran en dos maneras de separar los productos obtenidos, ya que por un lado se puede decidir separar los productos obtenidos después del proceso, o separarlos durante el proceso (recuperación in situ) (40) (39). Estas últimas, la mayoría aún en estudio, aportan una serie de ventajas respecto a las primeras en lo que a disminución de la intoxicación de los microorganismos presentes en el caldo de fermentación se refiere, ya que no se permite que la concentración de butanol supere nunca un determinado valor, además de un consecuente aumento en la productividad. Sin embargo hay que tener presente que puede provocar, dependiendo la técnica utilizada, otros tipos de problemas, como puede ser la contaminación del caldo si no se lleva a cabo en las condiciones óptimas (39).

A continuación se repasan los fundamentos de las técnicas más empleadas en la actualidad, describiendo las principales ventajas e inconvenientes de las mismas:

1.7.1 Destilación

Tradicionalmente la destilación ha sido la principal operación de separación empleada para separar los productos del caldo de la fermentación ABE (40). Existen diferentes maneras de llevar a cabo la separación mediante la destilación, como son: destilación flash en continuo, destilación batch, destilación fraccional y destilación con vapor (40).

Estas técnicas poseen numerosas desventajas, como son altos costes de investigación, baja selectividad y altos costes energéticos (40), ya que para destilar un caldo que contiene un 1% en masa de concentración de butanol se requiere 1,5 veces la energía contenida en el butanol obtenido (39). Por otro lado se ha observado que si la concentración fuera del 4% en masa de butanol, se necesitaría solamente 0,25 veces la energía que posee el butanol, por lo que podría ser una alternativa interesante si se consigue concentrar antes el butanol en la disolución (39).

1. Introducción

Como ventaja de esta operación de separación destacar que se obtienen concentraciones de butanol en torno al 98% en masa y que está ampliamente estudiada.

1.7.2 Stripping

Se trata de una técnica de recuperación in situ en la que se burbujean gases como nitrógeno libre de oxígeno, o incluso los propios gases creados durante la fermentación para separar la acetona, el butanol y el etanol (39). El gas que sale del fermentador con los productos es posteriormente condensado parcialmente de manera que los gases utilizados para recuperar el producto son recirculados al interior del reactor, mientras que los productos son llevados a otras operaciones de separación posteriores.

Esta técnica presenta como ventajas un aumento en el rendimiento y la productividad global de la fermentación debido a la disminución de la concentración de butanol en el caldo, además de que es barata y simple a la hora de llevarla a cabo, pudiendo utilizar los propios gases generados durante la fermentación. Además únicamente se separan los compuestos más volátiles, lo que permite mantener en el caldo metabolitos primarios imprescindibles para la fermentación como son el ácido acético y butírico, y no afecta para nada a los microorganismos (39) (40).

Por otro lado como desventajas se encuentra el hecho de que cuando se utilizan grandes flujos de gas para optimizar la operación, se forman grandes cantidades de espuma, lo que exige el uso de antiespumantes, que pueden afectar el rendimiento de la fermentación siendo tóxico para la bacteria (40).

1.7.3 Adsorción

La adsorción es una operación de separación interesante sobre todo desde el punto de vista económico (40). Para este proceso se utilizan una serie de partículas denominadas adsorbentes para las que se busca que el producto deseado de una mezcla se quede ligado a ellas.

Es importante escoger el adsorbente adecuado. Se debe tener en cuenta: la velocidad de adsorción, así como la capacidad de la misma, una fácil desorción posterior, alta selectividad para el producto deseado y coste del adsorbente. La cinética de la adsorción también es importante, ya que cinéticas rápidas permitirán utilizar un mayor flujo de alimentación y una menor cantidad de adsorbente (39).

La mayor parte de la investigación de esta operación está centrada en la separación del butanol del caldo de fermentación, por lo que se debe usar un adsorbente que tenga una alta selectividad por el butanol en presencia de otros muchos compuestos. Se ha encontrado que algunos adsorbentes que

1. Introducción

pueden ser utilizados son carbono activo, resinas poliméricas o zeolitas, cada uno de ellos con sus respectivas ventajas e inconvenientes (39).

Aunque se han encontrado buenos resultados en cuanto a la selectividad del butanol (40), es cierto que existen problemas con esta técnica aún, como son dificultades obtenidas en la operación de desorción que se debe llevar a cabo posteriormente, o la posibilidad de que las células se queden adheridas al adsorbente, lo que supone una pérdida en la efectividad del mismo, o incluso de la fermentación, ya que en algunas ocasiones el caldo es recirculado después de la adsorción (40).

1.7.4 Extracción líquido-líquido

En esta técnica el caldo de fermentación se pone en contacto con un disolvente que contiene agua y compuestos orgánicos de tal manera que el butanol es selectivamente eliminado del caldo ya que éste es más soluble en el disolvente que en el caldo de fermentación (39). El disolvente y el caldo de fermentación son normalmente insolubles por lo que su posterior separación se puede realizar de una manera sencilla.

Se debe tratar de encontrar un disolvente que sea lo menos tóxico posible para las células y que tenga una alta selectividad por el producto deseado, lo cual en el caso de la separación del butanol a menudo es un problema, ya que los disolventes más efectivos son altamente tóxicos para los microorganismos (39).

Diversos estudios han demostrado que la mejor manera de llevar a cabo la separación utilizando la extracción es emplear una mezcla de un disolvente tóxico con buenas propiedades y otro no tóxico (39). Así se ha comprobado que el disolvente con mayor rendimiento es una mezcla de alcohol oleico y benzoato de bencilo.

Comparado con otras técnicas de separación se puede obtener mayores rendimientos en la separación de butanol (40). Sin embargo, hay que tener presentes las desventajas que acompañan a esta operación, como pérdidas de disolvente, intoxicación de microorganismos, formación de emulsiones, e incluso acumulación de microorganismos en el disolvente utilizado para efectuar la separación (39).

Debido a estos problemas otros estudios han propuesto la utilización de la extracción líquido-líquido en columnas externas, tratando de incrementar la transferencia de materia y evitar la intoxicación de células así como la formación de emulsiones debido a la ausencia de agitación (39). Además permite el uso de disolvente tóxico y temperaturas diferentes a la de fermentación, sin embargo para utilizar estas últimas modificaciones

1. Introducción

descritas se debe antes utilizar algún método de retención de los microorganismos vía inmovilización o ultrafiltración (39).

1.7.5 Pertracción

La pertracción puede utilizarse para solucionar alguno de los problemas más importantes de la extracción líquido-líquido. En esta operación se utiliza una membrana que está en contacto por un lado con el caldo de fermentación, y por el otro con el disolvente utilizado para realizar la extracción. De esta manera ambas mezclas no están en contacto directo, y por lo tanto se pueden evitar así algunos problemas, como la formación de emulsiones o la intoxicación de microorganismos (39).

El éxito de esta técnica depende de una buena selección no solo del disolvente como ocurría en el caso de la extracción líquido-líquido, sino también de la membrana, la cual debe presentar una alta selectividad hacia el butanol (39).

Algunos de los disolventes más utilizados para esta operación de separación son: propilenglicol, tributirina, 1-octanol, 1-dodecanol y 2-etil-1hexanol (39).

Como ventajas de esta operación se encuentra la capacidad de poder unir la efectividad del disolvente con la selectividad de las membranas empleadas (41) (40), además de que gracias a la membrana se evita el paso del disolvente al caldo con la intoxicación de microorganismos que esto conlleva (42) (40).

Como limitaciones a este proceso se encuentra una disminución de los coeficientes de transferencia de materia respecto a la extracción líquido-líquido (43) (40), y ya a escala industrial pueden surgir problemas debido a la relativamente alta viscosidad de los disolventes empleados, resultando en pérdidas de presión y limitaciones de la transferencia de materia en la fase de la disolución (41) (40). Otro de los inconvenientes es el alto coste de las membranas, así como su alta tendencia a obstruirse (39).

1.7.6 Ósmosis inversa

La ósmosis inversa puede ser utilizada de dos maneras, por un lado se puede tratar de deshidratar el caldo obtenido tras la fermentación, o por el contrario se puede intentar eliminar el producto deseado si se encuentra una membrana que tenga la selectividad adecuada para ello (39).

En cualquiera de los dos casos el fundamento de la técnica es similar, se utilizan altas presiones para hacer pasar a través de una membrana semipermeable el agua o el producto dependiendo lo que se quiera hacer (39).

1. Introducción

La deshidratación del caldo puede estar unida a una posterior destilación, ya que de esta manera se consigue aumentar mucho la concentración de producto y así la destilación puede resultar más rentable desde un punto de vista económico (39).

Estudios (44), han demostrado que el uso de la ultrafiltración para eliminar las células antes de la ósmosis inversa lleva a mejores resultados, ya que se evita la obstrucción de las membranas. Sin embargo el módulo empleado para llevar a cabo la ultrafiltración se ha comprobado que también se obstaculiza con relativa facilidad, lo que provoca que se deba sustituir en muy poco tiempo (39).

1.7.7 Destilación en membrana

La destilación en membrana es una técnica en la que se utiliza una membrana microporosa e hidrofóbica para separar mecánicamente dos líquidos a temperaturas diferentes y soportar la interfase líquido vapor (45). En esta operación primeramente se calienta la alimentación hasta que se le suministra el calor latente de vaporización. Debido a que existe una diferencia de temperatura entre ambos lados de la membrana se creará una diferencia en las presiones de vapor a ambos lados, lo que provocará que el vapor generado atraviese la membrana (40) (45). Una vez que el vapor se encuentra en el otro lado de la membrana se debe condensar, y esto se puede hacer dentro o fuera de la célula, lo que dará lugar a diferentes tipos de destilación en membrana (45).

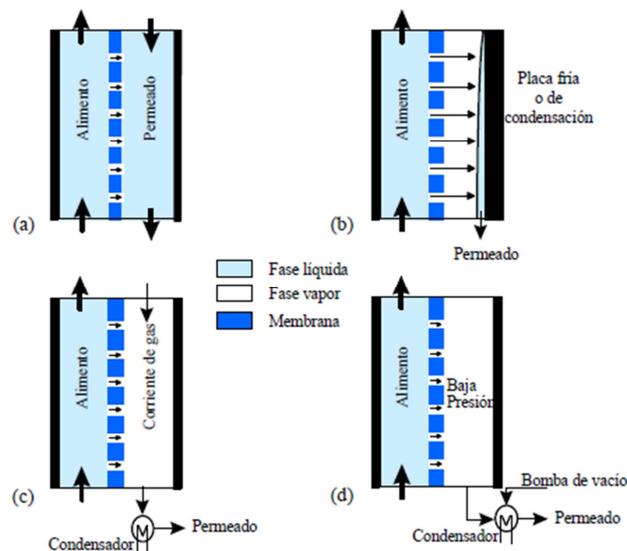


Figura 5. Tipos de destilación en membrana

La ventaja de esta técnica es que gracias a que la membrana es hidrofóbica únicamente atravesarán la misma los disolventes orgánicos (40), además de

1. Introducción

que se pueden utilizar temperaturas más bajas que en la destilación convencional y que el colmatado de los poros se produce con menor frecuencia que en otras operaciones de membrana gracias a que los poros tienen un tamaño mayor (45).

Como mayor desventaja se encuentra la necesidad de impedir que el líquido penetre en los poros de la membrana, cosa que ocurre cuando el líquido tiene la presión suficiente. Esta presión dependerá de la membrana, del tipo de disolución, de su concentración y de la temperatura empleada. Esto es importante porque una vez que sucede es muy difícil restaurar la hidrofobicidad de la membrana (45).

1.7.8 Pervaporación

La pervaporación se trata de un proceso en el que los componentes de una mezcla son separados gracias a una vaporización parcial a través de una membrana (39). Es una técnica muy interesante, empleada para purificar líquidos difícilmente separables a través de la destilación convencional (45).

En esta ocasión la alimentación está en contacto directo con un lado de la membrana, mientras que el permeado es eliminado como vapor al otro lado de la misma aplicando una presión parcial reducida (39) (45).

La diferencia con la destilación en membranas reside en que en esta únicamente se da un transporte a través de la membrana del permeado en estado vapor, no interviniendo directamente en la separación (función mecánica), mientras que en la pervaporación se da un transporte selectivo por fenómenos de solubilidad y difusión a través de la membrana que marcarán la selectividad de la misma (45).

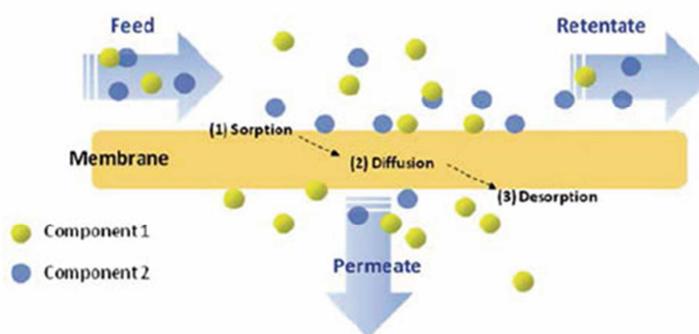


Figura 6. Esquema de la pervaporación.

Como ventajas de este proceso destaca su alta selectividad, así como una baja temperatura de operación requerida o la no necesidad de utilizar agentes de separación que puedan contaminar la fermentación (39).

1. Introducción

Como desventajas destacar que el flujo de permeado suele ser bajo, lo que lleva a tener que emplear grandes áreas superficiales (39).

Como conclusión destacar que hoy en día las investigaciones tienden a utilizar procesos híbridos, en los que se utiliza las ventajas de la recuperación in situ de los productos junto con las ventajas de los procesos convencionales. Y es que pese a que los procesos in situ requieren una menor cantidad de energía respecto a los convencionales y mejoran la productividad, no son capaces de llegar por si mismos en una única etapa hasta las condiciones de venta de producto, por lo que una asociación de los mismos se hace necesaria (46).

2. Objetivos

2. Objetivos

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es el estudio de un proceso de fermentación en continuo para la obtención de butanol, utilizando sacarosa como sustrato mediante el microorganismo *Clostridium beijerinckii*.

Para lograr este objetivo final, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Realización de ensayos en discontinuo con diferentes concentraciones de sustrato, para establecer las condiciones de operación más adecuadas.
- Obtención a partir de los datos anteriores de las etapas implicadas en la fermentación, así como de los parámetros cinéticos y biológicos del proceso.
- Diseño de una planta piloto-laboratorio que comprenda el dimensionado de los biorreactores y del equipo auxiliar necesario.
- Arranque de la planta y planteamiento de estrategias de operación de forma que en los biorreactores se simulen las fases acidogénica y solventogénica y demuestren la viabilidad del proceso.
- Planificación de ensayos en continuo analizando la influencia de la velocidad de dilución en la productividad y concentración del producto final.

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismo utilizado y condiciones de cultivo

3.1.1 Microorganismo

El microorganismo utilizado en este estudio fue *Clostridium Beijerinckii* DSM 6422, adquirido en la Colección Alemana de Microorganismos y cultivos (DSMZ).

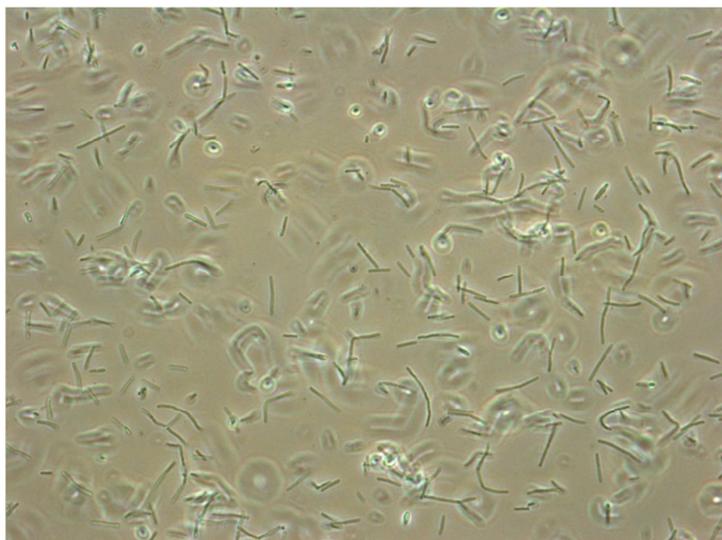


Figura 7. *Clostridium Beijerinckii* (x20).

3.1.2 Mantenimiento y formación del inóculo

La cepa se conservó en Reinforced Clostridial Medium, RCM, (Fluka, Sigma-Aldrich, España) en tubos Hungate (18x150 mm), en forma de esporas y conservada a -20 °C en condiciones anaerobias.

Para preparar el medio de crecimiento se utilizaron penicilin flasks de 150 ml. El medio de crecimiento se compuso de una disolución que contenía el sustrato fermentable(I): 30 g/l de sacarosa, 1 g/l de extracto de levadura; una disolución de buffer(II): 0,5 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de K₂HPO₄, 2,2 g/l de acetato de amonio; una disolución de sales (III): 0,2 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de MnSO₄·H₂O, 0,01 g/l de NaCl, 0,01 g/l de FeSO₄·7H₂O; y una disolución de vitaminas (IV): 0,001 g/l de PABA, 0,001 g/l de Tiamina, y 0,00001 g/l de Biotina.

El procedimiento establecido para la preparación del medio de crecimiento fue el siguiente:

Primeramente se burbujeó nitrógeno libre de oxígeno durante 10 minutos en cada una de las disoluciones por separado para crear las condiciones anaerobias requeridas.

3. Materiales y métodos



Figura 8 Método utilizado para extraer el oxígeno.

Posteriormente se autoclavó la disolución de azúcares para esterilizar el medio a 121 °C durante 20 minutos. A continuación se añadieron las disoluciones restantes a la disolución de azúcares en una cámara de flujo laminar utilizando filtros esterilizados (0,22 μm), finalizando así la preparación del medio de crecimiento.

Previamente a la inoculación del microorganismo dentro del medio preparado se realizó un choque térmico al mismo, introduciendo el tubo hungate donde se encontraba la cepa dentro de un baño de agua a 80 °C nada más sacarla del congelador durante 3,5 minutos, estimulando la germinación de esporas. Posteriormente se enfrió de nuevo durante 1 minuto con agua a temperatura ambiente.

Por último los microorganismos se inocularon (10 % v/v) al medio de crecimiento y se incubaron a 35 °C con una agitación de 175 rpm durante 24-48 horas.

3.1.3 Medio de fermentación

Tanto para la operación en discontinuo, como en continuo el medio de fermentación se preparó de tal manera que todos los compuestos y concentraciones fueron semejantes a los utilizados para la obtención del medio de crecimiento, residiendo la diferencia principal en la cantidad preparada.

Para la operación en discontinuo se prepararon 900 ml de medio de fermentación y 100 ml de inóculo.

La disolución de azúcares fue primeramente cargada en el reactor y posteriormente autoclavada junto con él a 121 °C y durante 20 min.

3. Materiales y métodos

Después, cuando se enfrió el reactor hasta la temperatura de fermentación, las disoluciones restantes fueron añadidas para evitar así la pérdida de propiedades de los diferentes compuestos añadidos al medio.

Finalmente se inoculó el microorganismo en el reactor y comenzó la operación en batch.

Para la operación en continuo, primeramente se preparó una disolución madre de 2L que contenía el sustrato. Posteriormente la disolución fue repartida en diferentes botellas esterilizables de 1 L con un volumen de trabajo de 650 ml. Éstas después fueron autoclavadas para asegurar las condiciones de esterilidad.

Las disoluciones de buffer, sales y vitaminas se prepararon en Erlenmeyers de 250 ml.

Después en la cámara de flujo laminar se adicionaron 15,5 ml de cada una de las disoluciones de buffer, sales y vitaminas de manera que se conservaran las mismas concentraciones presentes en el medio de crecimiento, obteniéndose así 696,5 ml de alimentación para recargar la alimentación de la planta.

Finalmente, se procedió a la inoculación de los microorganismos en los biorreactores, siempre respetando que la concentración de los mismos fuera de un 10% v/v. En el apartado 4 se habla más en detalle sobre este aspecto en la sección 4.2.4 arranque.

3.2 Sustrato

Como sustrato se utilizó sacarosa comercial para todos los experimentos realizados.

3.3 Experimentación con biorreactores

3.3.1 Experimentación en batch

Reactor BIOSTAT BPlus-2L

El reactor procede de la firma SARTORIUS y presenta dos litros de volumen útil. Cuenta con sondas de temperatura, nivel, oxígeno y pH que pueden ser insertadas en la tapa superior para monitorizar y controlar las condiciones existentes dentro del mismo. Además posee un agitador de palas acoplado a la tapa superior, un difusor que permite la dispersión de gases, un orificio para toma de muestras y un condensador.

Se trata de un reactor automatizado, manipulable mediante una pantalla táctil, capaz de controlar la temperatura en su interior gracias a la presencia

3. Materiales y métodos

de un encamisado alrededor del mismo utilizando agua como fluido refrigerante, controlar el pH mediante la adición de algún ácido o base previamente provisto utilizando una o varias de las cuatro bombas peristálticas con las que viene equipado, o incluso controlar el nivel de líquido presente en el reactor introduciendo o extrayendo líquido del mismo, así como el caudal de gas a introducir comparando el flujo existente con una referencia dada.



Figura 9. Reactor BIostat BPlus

3.3.2 Experimentación con 2 biorreactores en continuo

Para la operación en continuo se diseñó una planta experimental compuesta por dos biorreactores encamisados de 0,5 L (R1) y 1 L (R2) de volumen útil respectivamente, de tal manera que era posible el mantenimiento de la temperatura en el interior de los mismos. Para poder llevar a cabo el experimento, se utilizaron tres bombas peristálticas que permitían mantener los flujos de operación constantes, y por tanto el estado estacionario.

Para la agitación se utilizaron agitadores magnéticos con imanes de diferentes tamaños para cada reactor. Para el correcto suministro de la alimentación al conjunto de la planta se dispuso de un tanque de alimentación (T1), de manera que se pudiese asegurar unas condiciones anaerobias y estériles lo más estrictas posibles.

La adición de nitrógeno (N₂) para establecer las condiciones anaerobias, se realizó mediante una red de tubos conectados a los biorreactores y al tanque de alimentación.

3. Materiales y métodos



Figura 10. Planta piloto para operación en continuo

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinación de azúcares, ácidos y solventes

La sacarosa, así como los productos de la fermentación, fueron analizados por HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H junto con un detector de medida del índice de refracción. Como fase móvil se utilizó una disolución 0,01 N de H₂SO₄ con un flujo de 0,6 ml/min, y se operó con una temperatura en la columna de 30 °C. Previamente todas las muestras se diluyeron para poder ser correctamente analizadas (1:5), y se centrifugaron a 13400 rpm durante 10 min para separar los sólidos presentes en las mismas. Además una vez centrifugadas se filtraron utilizando filtros de nylon con 0,2 µm de porosidad.

3.4.2 Medida de la biomasa

La cantidad de biomasa se determinó a través de la densidad óptica (OD) de las muestras recogidas, medida con una absorbancia de 600 nm en un espectrofotómetro HITACHI U200 UC/visible (Hitachi Ltd, Tokyo, Japón).

3.4.3 Observación microscópica de los cultivos

La observación se realizó utilizando un microscopio (LEICA DM 400B) provisto de una lámpara de mercurio y otra halógena, además de cuatro lentes (5x, 10x, 20x y 100x). Para la visualización a través de un ordenador, y para la obtención de fotografías, se empleó el software LEICA APPLICATION SUITE.

4. Resultados

4.1 Experimentación en discontinuo

Se llevó a cabo experimentación en discontinuo con una doble finalidad; por una parte, establecer los periodos de las fases acidogénica y solventogénica implicadas en la fermentación, y por otra, determinar los parámetros cinéticos y biológicos del proceso. En este sentido se dispusieron de datos de la evolución temporal de las concentraciones de sustrato, disolventes generados y biomasa producida.

Los experimentos en discontinuo se llevaron a cabo en un reactor de 2 litros de volumen útil (BiostatBplus) equipado con un sensor de temperatura, nivel y pH. Este último fue controlado con un valor de 4,5, la temperatura en el interior del reactor se mantuvo en 35°C utilizando agua como fluido refrigerante, y la agitación se mantuvo a 175 rpm. Se plantearon dos ensayos utilizando concentraciones iniciales de sacarosa de 60 g/L y 30 g/L.

4.1.1 Concentración de sustrato de 60 g/L

En este experimento se utilizó una concentración inicial de sacarosa de 60 g/l. La duración del mismo fue de 120 horas. Se han obtenido datos de la concentración de sustrato en todo momento, así como de todos los ácidos y disolventes generados, y de la biomasa presente en el bioreactor.

Los resultados pueden consultarse en el anexo I, apartado 1.1 en las tablas 8 y 9.

4. Resultados

Evolución de los disolventes

Se muestra en la figura 11 la evolución de cada uno de los disolventes (acetona, butanol y etanol) durante todo el experimento.

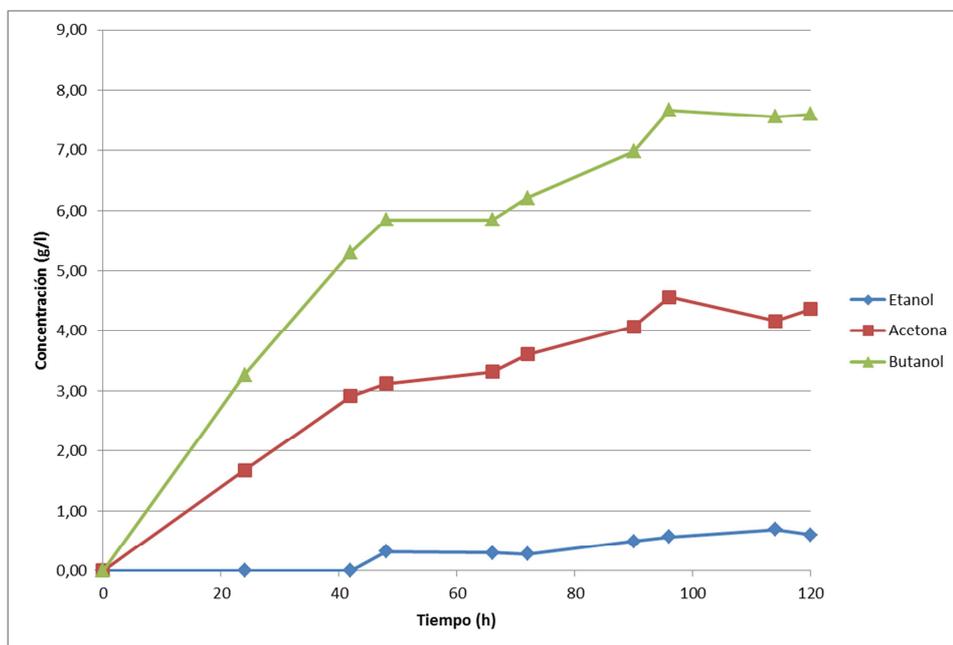


Figura 11. Evolución de los disolventes

En la figura anterior se observa como la evolución de la concentración de acetona y butanol sigue un patrón muy parecido, siendo siempre superior la de butanol y llegando a un máximo a las 96 horas de 7,67 g/l, frente a 4,56 g/l de acetona.

Cabe destacar que cuando la concentración de butanol llega a un valor en torno a 7.60 g/l la concentración del mismo se mantiene, y la concentración de biomasa disminuye de manera importante tal y como se puede comprobar en la figura 12. Esto sugiere que se produce una cierta inhibición a causa del mismo.

Por otro lado se observa como la concentración de etanol siempre está muy por debajo de las otras dos, siendo prácticamente despreciable hasta las 40 horas de experimentación, y manteniéndose posteriormente en un valor de en torno a 0,3 g/l hasta alcanzar un máximo de 0,69 g/l a las 114 horas.

4. Resultados

Evolución del sustrato y microorganismos

En la figura 12 se observa cual fue la concentración de la sacarosa y de los microorganismos a lo largo de todo el experimento.

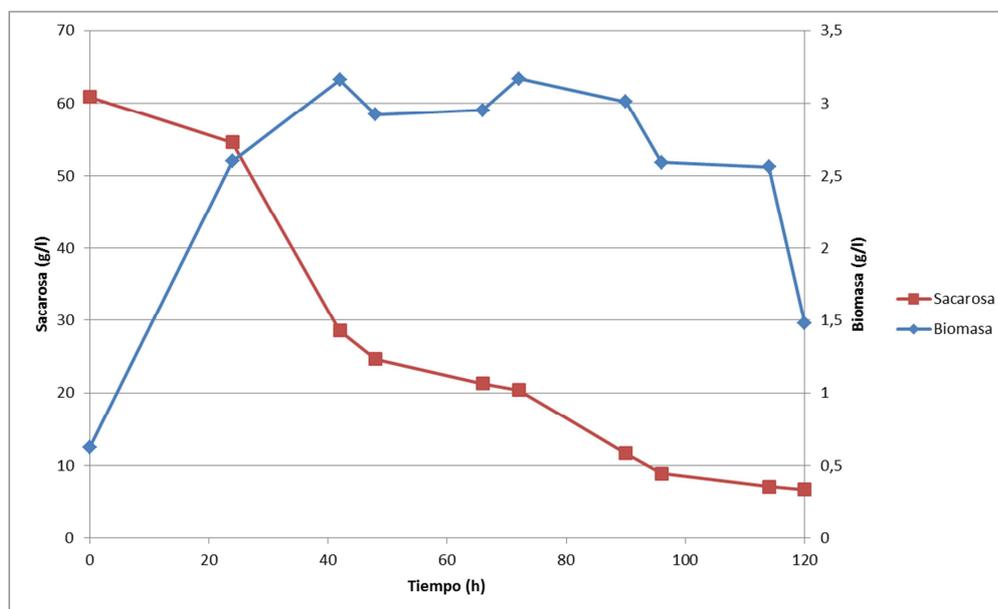


Figura 12. Evolución del sustrato y microorganismos

Como se puede observar en la figura anterior la concentración de microorganismos describe una evolución típica en la que se puede distinguir una fase de crecimiento exponencial hasta las 40 horas aproximadamente en la que la concentración de biomasa crece de manera muy rápida, una fase de mantenimiento hasta las 90 horas en la que no hay cambios notables en la concentración de microorganismos, y finalmente se observa una última fase de muerte celular en la que la concentración de biomasa decrece con el tiempo .

Respecto a la concentración de sacarosa, se observa como no se ha llegado a consumir completamente, llegando a un valor final de 6,73 g/l a las 120 horas de experimentación. Destacar además como el consumo de la misma es muy inferior en las primeras 24 horas de experimentación respecto al resto, causado probablemente por un periodo de fase lag de los microorganismos.

4. Resultados

Evolución de sustrato, ácidos y disolventes

En la figura 13 se indica cuál ha sido la concentración total de la suma de ácidos y disolventes presentes en el biorreactor, y se muestra a su vez la relación de los mismos con la concentración de sustrato.

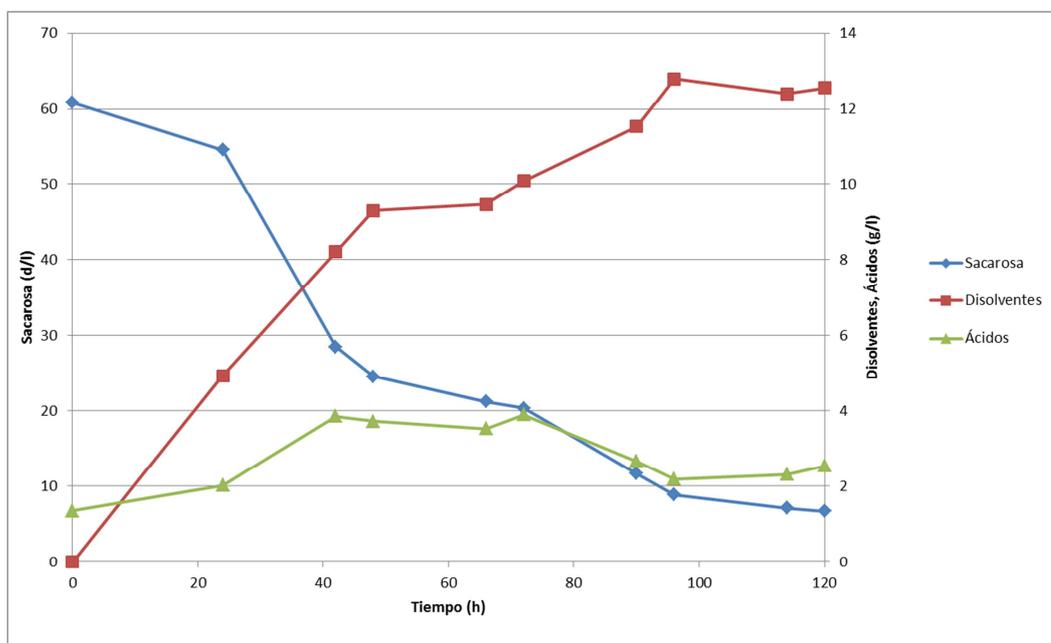


Figura 13. Evolución de sustrato, ácidos y disolventes.

Según se puede comprobar en la figura 13, la concentración de disolventes es siempre superior a la de ácidos excepto durante las primeras horas de experimentación en las cuales los microorganismos se hallan en fase acidogénica. Después la concentración de disolventes es siempre muy superior a la de ácidos, llegando a ser al final de la experimentación de 12,56 g/l.

La concentración de ácidos por su parte alcanza un máximo en torno a las 70 horas con un valor de 3,90 g/l.

Tal y como se observa en las gráficas, cuando la velocidad de consumo de sacarosa es mayor, también lo es la velocidad de creación de disolventes. La de ácidos únicamente lo es en las primeras horas, ya que hacia el final del experimento se observa como su concentración disminuye pese a estarse consumiendo la sacarosa, debido probablemente a la transformación de los ácidos en disolventes por parte de los microorganismos.

4. Resultados

Evolución de los ácidos

En la figura 14 se muestra cual ha sido la evolución de la concentración tanto del ácido acético como del ácido butírico a lo largo de todo el experimento.

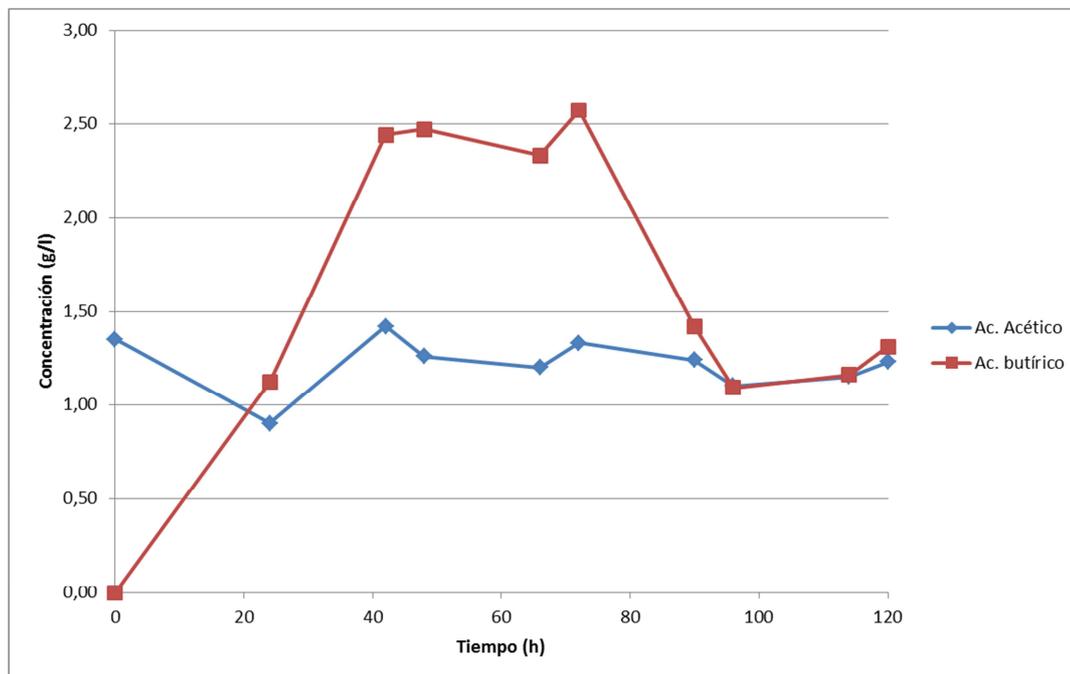


Figura 14. Evolución de los ácidos.

En la figura 14 se observa como la concentración del ácido acético se mantiene más o menos constante durante las 120 horas situándose en un valor en torno a 1,25 g/l. La concentración del mismo únicamente es superior a la de butírico durante las primeras 20 horas, momento tras el cual la concentración de butírico sufre un aumento importante dando lugar a un máximo en torno a 2,50 g/l que se mantiene más o menos constante hasta las 80 horas.

Finalmente destacar como la concentración de ambos ácidos se hace muy similar hacia el final de la experimentación.

4. Resultados

4.1.2 Concentración de sustrato de 30 g/L

En este segundo experimento en discontinuo se utilizó una concentración de sacarosa de 30 g/l. En esta ocasión se midió la cantidad de sustrato presente en el bioreactor, los disolventes y la cantidad de microorganismos a cada instante. La duración del experimento fue de nuevo de 120 horas.

Los resultados de este experimento pueden encontrarse en el anexo I en el apartado 1.2, en la tabla 10.

A continuación se comentan los resultados obtenidos al igual que se hizo con el primer experimento.

Evolución de los disolventes

En la figura 15 se muestra la evolución de la concentración de cada uno de los disolventes presentes en el medio de fermentación a lo largo del periodo de experimentación.

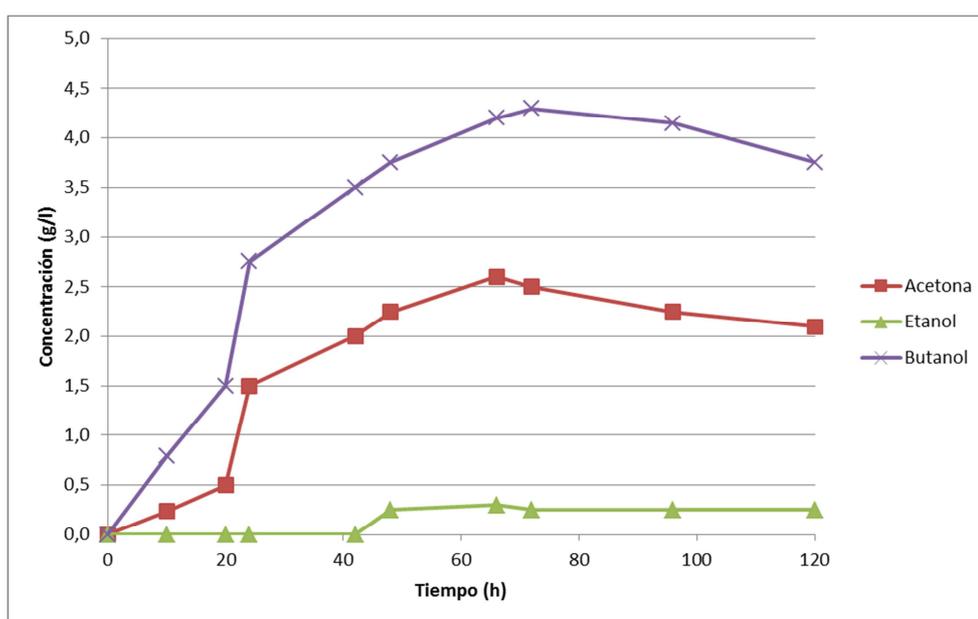


Figura 15. Evolución de los disolventes

Tal y como se puede observar en la figura 15, la concentración de butanol y la de acetona siguen un comportamiento muy similar, estando presente el butanol con una mayor concentración a lo largo de las 120 horas, tal y como es característico en la fermentación ABE.

La concentración de butanol llega a un máximo en torno a las 70 horas, momento en el cual la concentración del mismo es de 4,30 g/l. Un poco antes la acetona presenta también un máximo de 2,60 g/l.

4. Resultados

Por último comentar que la concentración de etanol es de 0 g/l durante las primeras 40 horas para posteriormente subir y estabilizarse en torno a 0,25 g/l, presentando un máximo de 0,3 g/l a las 66 horas de experimentación.

Evolución de sustrato y microorganismos

En la figura 16 se representa la evolución de la concentración de los microorganismos frente al consumo de sacarosa.

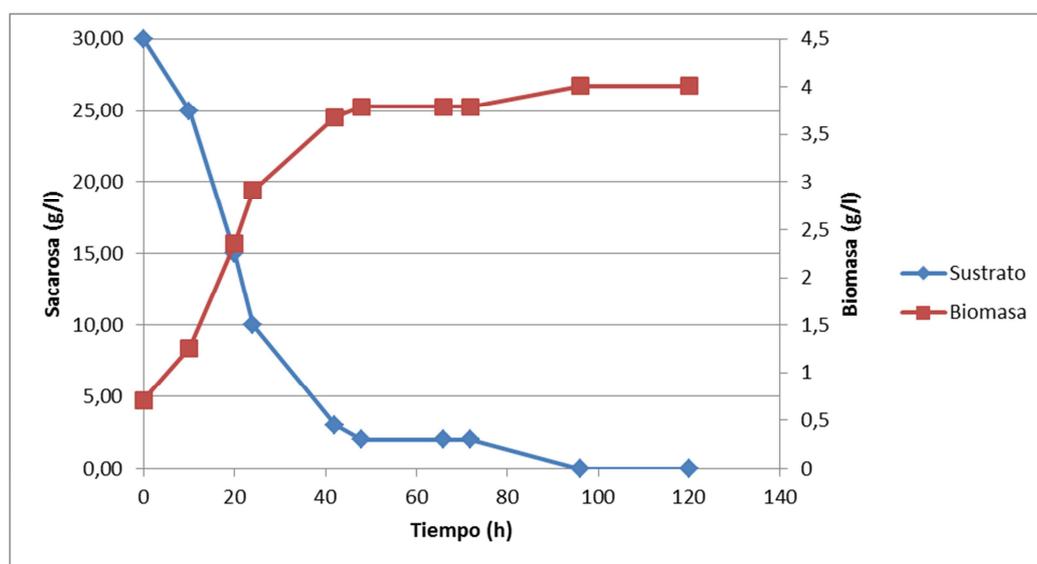


Figura 16. Evolución de sustrato y microorganismos.

En esta figura se observa un descenso de sustrato muy pronunciado en las primeras 40 horas de experimentación, para luego establecerse en torno a 2,5 g/l durante unas 30 horas. Finalmente se puede comprobar como cerca de a las 100 horas la concentración de sacarosa es de 0 g/l en el interior del reactor, por lo que la utilización del sustrato es completa.

Respecto a la concentración de microorganismos, destacar como hay un cambio de pendiente en torno a las 25 horas donde el consumo de sacarosa disminuye. Este cambio de pendiente viene precedido de una pequeña estabilización de la concentración de biomasa aunque no se puede apreciar en las gráficas, correspondiente al proceso de intoxicación ácida (47). En este punto en el que los microorganismos se hallan en fase acidogénica, la concentración de ácido butírico es máxima, lo que provoca una cierta intoxicación en los microorganismos durante un breve periodo de tiempo, en el que la concentración de sacarosa debería mantenerse más o menos constante.

4. Resultados

Después de este periodo la concentración de biomasa vuelve a subir de nuevo aunque ya no tan rápido como antes. Estudios han demostrado que esto puede ser debido a una ruptura de las células durante el proceso de intoxicación de tal manera que ahora se produce el crecimiento de células mucho más pequeñas (47).

4.1.3 Comparación en función de la concentración de sustrato

Para la elección de la concentración de sustrato a utilizar durante la operación en continuo, se van a emplear una serie de datos obtenidos a partir de los dos experimentos anteriores de modo que sea más fácil realizar la elección. Estos datos se muestran en las tablas 1 y 2.

En la tabla 1 que se muestra a continuación, aparecen las concentraciones máximas de cada uno de los disolventes presentes en el biorreactor, así como la concentración final de sustrato. Destacar que el número entre paréntesis representa la hora a la que se alcanzó dicho valor.

Concentración inicial sustrato (g/l)	C. final sustrato (g/l)	C máx butanol (g/l)	C máx acetona (g/l)	C máx etanol (g/l)	C máx disolventes (g/l)
60	6,73 (120)	7,67 (96)	4,56 (96)	0,69 (114)	12,80 (96)
30	0 (96)	4,30 (72)	2,60 (66)	0,30 (66)	7,10 (66)

Tabla 1. Resumen de resultados en discontinuo

En vista de estos datos, se observa como en el primer experimento en el que la concentración de sustrato es del doble que en el segundo, la concentración de todos y cada uno de los disolventes es mayor, siendo esta en torno al doble respecto al segundo experimento.

Destacar por otro lado como la utilización de sacarosa es completa en el caso de la operación en discontinuo con 30 g/l de concentración inicial de sustrato, mientras que con 60 g/l es aproximadamente del 89%.

De los resultados obtenidos se observa además como la concentración máxima de acetona butanol y etanol se alcanza mucho antes cuando la concentración inicial de sustrato es menor.

4. Resultados

4.1.4 Determinación de parámetros biológicos y cinéticos

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se procedió al cálculo de los coeficientes de rendimiento y los ratios entre los disolventes producidos y biomasa generada, respecto del consumo de sustrato.

Coefficientes de rendimiento

Los rendimientos mostrados en la tabla 2 son los máximos obtenidos, y el ratio resultante es una media de los correspondientes a distintos tiempos de experimentación.

$$Y_{ABE/s} = \left(\frac{\text{disolventes} - \text{disolventes iniciales}}{s_0 - s} \right)$$

$$Y_{\text{but}/s} = \left(\frac{\text{butanol} - \text{butanol inicial}}{s_0 - s} \right)$$

$$Y_{x/s} = \frac{x - x_0}{s_0 - s}$$

$$\text{Ratio butanol} = \frac{\text{butanol}}{\text{butanol} + \text{acetona} + \text{etanol}}$$

$$\text{Ratio acetona} = \frac{\text{acetona}}{\text{butanol} + \text{acetona} + \text{etanol}}$$

$$\text{Ratio etanol} = \frac{\text{etanol}}{\text{butanol} + \text{acetona} + \text{etanol}}$$

Concentración inicial sustrato (g/l)	$Y_{ABE/s}$ (g/g)	$Y_{\text{but}/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Ratio Butanol	Ratio Acetona	Ratio Etanol
60	0,25 (96)	0,15 (96)	0,13 (24)	6,4	3,1	0,4
30	0,25 (66)	0,15 (66)	0,11 (24)	6,1	3,6	0,2

Tabla 2. Parámetros principales

De los rendimientos se observa como son iguales en ambos casos excepto el que a microorganismos sustrato se refiere, teniendo en cuenta que se necesita el doble de tiempo para llegar a ellos en el caso de $Y_{ABE/s}$ y $Y_{\text{but}/s}$.

Por otro lado comentar como los ratios son muy similares en ambos casos siendo levemente superior el de butanol cuando se utilizan 60 g/l de concentración de sustrato inicial.

4. Resultados

Una vez comparados ambos experimentos se ha decidido emplear una concentración de 30 g/l para realizar la operación en continuo debido a que si bien las concentraciones de producto son mucho mayores en el caso en el que la concentración de sacarosa inicial es de 60 g/l, se observa también como la utilización de sustrato no es completa por lo que se estaría desperdiciando parte del mismo.

Además pese a que las concentraciones son mucho más elevadas, a la hora de evaluar los rendimientos, si bien son iguales o superiores en el caso en el que se emplea una mayor concentración inicial, no lo son por mucho margen, y el tiempo que se tardan en conseguir es mucho más elevado, lo que puede afectar gravemente al dimensionado de los biorreactores, necesitando volúmenes mucho mayores o flujos muy pequeños.

4.1.5 Velocidad de crecimiento máxima

Una vez elegida la concentración de sustrato inicial a emplear (30 g/l), se procede al cálculo de la velocidad de crecimiento máxima de los microorganismos (μ_{\max}), que nos permitirá posteriormente dimensionar correctamente los biorreactores en la operación en continuo.

Para ello se va a utilizar la siguiente expresión con los datos experimentales obtenidos y mostrados anteriormente:

$$\mu_{\max} = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \rightarrow \mu_{\max} = \frac{d \ln x}{dt}$$

Para obtener la velocidad máxima de crecimiento se necesitan los datos del logaritmo neperiano de la concentración de microorganismos frente al tiempo, los cuales se muestran a continuación en la tabla 3.

Tiempo(h)	X (g/l)	ln X
0	0,71	-0,342
10	1,26	0,231
20	2,36	0,858
24	2,91	1,068
42	3,68	1,302
48	3,79	1,332
66	3,79	1,332
72	3,79	1,332
96	4,01	1,388
120	4,01	1,388

Tabla 3. Biomasa frente al tiempo.

4. Resultados

A continuación se procede a representar los datos de manera que se pueda extraer a partir de la pendiente correspondiente a la fase de crecimiento exponencial el valor deseado.

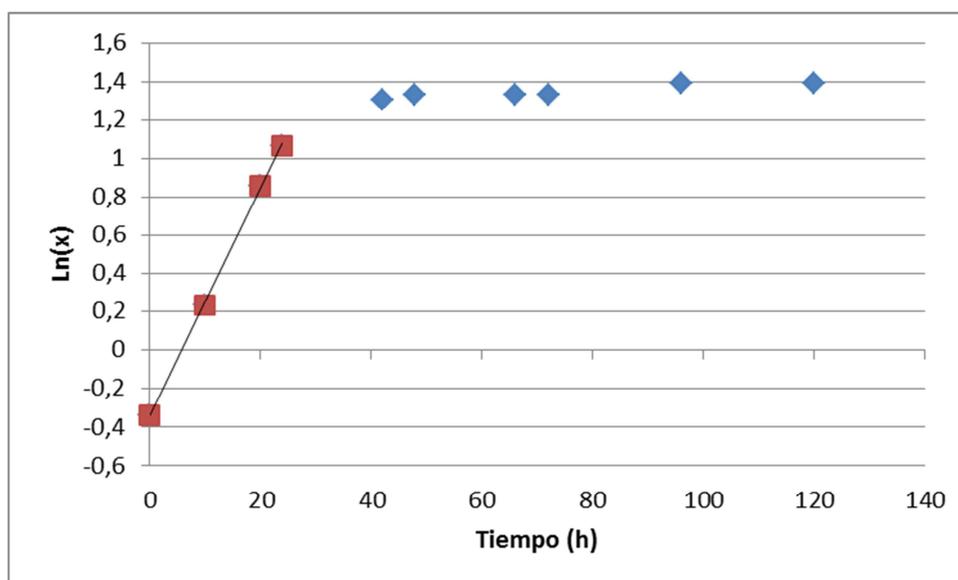


Figura 17. Ln de la biomasa frente al tiempo

El ajuste de los datos se ha realizado empleando el método de los mínimos cuadrados, con una $R^2=0,9994$.

$$y = 0,0594x - 0,348$$

Por lo tanto se considera:

$$\mu_{\max} = 0,06 \text{ h}^{-1}$$

En la bibliografía se reseña un valor de velocidad de crecimiento $\mu_{\max} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ (47), lo que indica una cinética de generación mayor de microorganismos, si bien las condiciones de operación indicadas son sensiblemente diferentes a las del presente trabajo.

4. Resultados

Conclusiones

De los experimentos realizados en discontinuo se ha comprobado cómo resulta más eficaz la utilización de 30 g/l de sacarosa en lugar de 60 g/l, ya que como se ha comentado pese a que la concentración de productos sea superior, a la hora de analizar los rendimientos los resultados son muy similares.

Por otra parte una vez escogida la concentración a utilizar se ha determinado que la velocidad máxima de crecimiento para el sustrato y medio empleado es de 0.06 h^{-1} , encontrando en la bibliografía además un valor de $0,12 \text{ h}^{-1}$ para unas condiciones de operación sensiblemente diferentes.

4. Resultados

4.2 Operación en continuo

Para operar en continuo se seleccionó la estrategia de utilizar dos biorreactores en serie, estableciendo como criterio de diseño el que tuvieran lugar las fases implicadas en la fermentación en cada uno ellos. De esta manera, en el primero de ellos se produciría la fase acidogénica, en la que se pretende que los microorganismos crezcan rápidamente, y en el segundo de ellos la solventogénica, donde se espera obtener los productos principales.

4.2.1 Dimensionado de los biorreactores

El primer paso en el diseño de la planta consistió en obtener la velocidad de dilución del primer biorreactor, en el que se llevaría a cabo la fase acidogénica. La velocidad máxima de dilución corresponde con la velocidad máxima de crecimiento tal y como se demuestra a partir de un balance de materia a los microorganismos del primer reactor (1):

$$\dot{V} \cdot (x - x_0) = V \cdot r_x \quad (1)$$

Se analiza ahora el término de reacción:

$$r_x = \mu \cdot x \quad (2)$$

Sustituyendo la ecuación 2 en la ecuación 1, y teniendo en cuenta que la velocidad de dilución (D) se define como el caudal dividido entre el volumen, se obtiene:

$$D = \frac{\dot{V}}{V} \quad (3)$$

$$D \cdot (x - x_0) = \mu \cdot x \quad (4)$$

Por último se debe tener en cuenta que la alimentación entra en condiciones estériles ($x_0 = 0$). Finalmente resulta la siguiente expresión:

$$D = \mu \quad (5)$$

Por lo tanto si se conoce la velocidad de crecimiento de los microorganismos, se conocerá la velocidad de dilución.

Los experimentos realizados en discontinuo, condujeron a un valor de la velocidad de crecimiento de los microorganismos $\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$, mientras que en la bibliografía se reseñaba un valor de $0,12 \text{ h}^{-1}$. Estos valores se utilizaron para el dimensionado del primer reactor (R1), donde tiene lugar la fase acidogénica.

4. Resultados

Para el segundo reactor (R2) se estableció un valor de la velocidad de dilución cinco veces menor, de tal manera que se completara la fase solventogénica y pudiera agotarse además completamente el sustrato.

Los volúmenes útiles que se fijaron, para llevar a cabo la fermentación, fueron de 150 mL para el primer reactor y de 750 mL para el segundo reactor. Los volúmenes finales fueron sobredimensionados para asegurar una correcta operación que pudiera derivarse de la formación de espumas, arrastre por gases, etc.

Una vez fijado el volumen y también la velocidad de dilución, según la ecuación 3, es posible calcular el flujo que las bombas deben aportar, para poder operar en estado estacionario..

4.2.2 Construcción y puesta a punto de la planta

Debido al pequeño caudal con el que se debía trabajar, se encontraron problemas a la hora de bombear el líquido, por lo que se realizaron múltiples pruebas con tubos de diferentes diámetros hasta que se comprobó que los tubos de 4cm de diámetro eran los mejores.

Una vez escogido el tamaño de los tubos a utilizar se realizó el calibrado de las bombas de manera automática (con el software instalado en la bomba), y de manera manual (medida volumen / tiempo, hasta conseguir los flujos deseados).

Una vez que las bombas funcionaban se realizaron pruebas hidráulicas para comprobar que el nivel se mantenía constante dentro de los reactores. Para ello antes de montarlos se comprobó con probetas durante varios días que el nivel de las mismas no experimentaba cambios bruscos, consiguiendo finalmente variaciones de nivel al cabo de 2 días de operación en torno a 7 ml en el primer reactor y 20 ml en el segundo utilizando agua para realizar las pruebas, por lo que se consideró que el nivel se mantenía lo suficientemente constante.

Por último se realizaron diferentes ensayos durante 48 horas ya con los biorreactores hasta que se consiguió un correcto funcionamiento, en el que la planta funcionó en condiciones totalmente similares a las de operación en cuanto a lo que niveles, caudales, agitación o temperatura de los tanques se refiere. Estas últimas pruebas se realizaron con medio de fermentación sin microorganismos, y así se comprobó la consistencia de la instalación.

4. Resultados

4.2.3 Modo de operación

En la figura 18 se puede observar un esquema de la planta que se ha empleado para operar en continuo. La planta consta de dos reactores encamisados R1 y R2 con 0,5 L y 1 L de volumen útil respectivamente. Los volúmenes utilizados para realizar los experimentos, han sido 150ml y 750 ml. Además se utilizaron tres bombas peristálticas que proporcionaban el caudal necesario para mantener constante el nivel de los tanques.

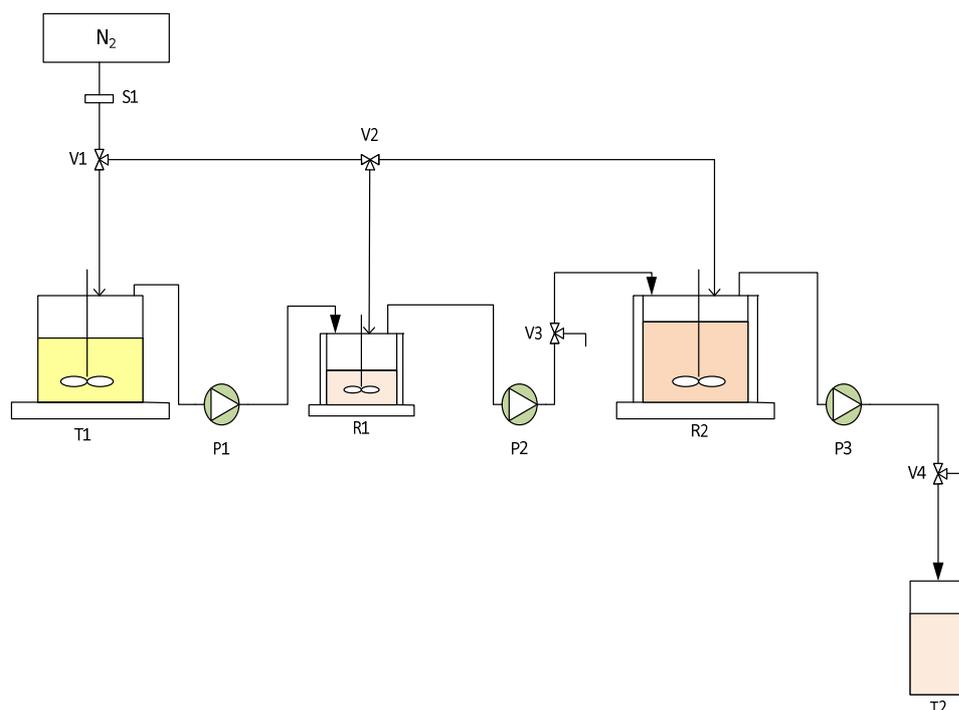


Figura 18. Esquema de la planta piloto

Se disponía además de dos depósitos adicionales: en el tanque T1 es donde se almacenó la alimentación que pasaría posteriormente al reactor 1, y el tanque T2 se utilizó para recoger el producto.

Para mantener la temperatura constante a 35 °C se utilizó un termostato que vehiculaba agua como fluido de intercambio a través de la camisa de ambos reactores. Para efectuar una correcta agitación, se emplearon agitadores magnéticos tanto en ambos reactores, como en el Tanque T1 de alimentación, manteniendo así la homogeneidad de la mezcla.

El nitrógeno libre de oxígeno suministrado a partir de una bombona, fue burbujeado de manera discontinua en el interior de R1, R2 y T1, de manera que se conservaran las condiciones anaerobias del experimento. A la salida de la bombona se instaló un filtro estéril de 0,22 µm para evitar así la

4. Resultados

contaminación del experimento en la medida de lo posible. Las válvulas V1 y V2 se utilizaron para permitir o no el suministro de nitrógeno a todos los tanques, pudiendo así burbujear únicamente uno de ellos si era necesario sin tener que hacerlo en el resto.

Toma de muestras

Se tomaron muestras cada 24 horas aproximadamente de ambos reactores, para medir las concentraciones de sacarosa, ácido butírico, ácido acético, acetona, butanol y etanol presentes en los mismos. La toma de las mismas se realizó a través de las válvulas de tres vías V3 y V4.

Destacar que durante la experimentación se realizaron modificaciones en diversas partes de la planta hasta que se llegó al esquema final mostrado en la figura 18. Los motivos de estos cambios fueron dirigidos a encontrar las máximas condiciones de esterilidad en la instalación.

4.2.4 Arranque

La estrategia de arranque varió en cada uno de los experimentos, y estuvo muy condicionada por el problema de intoxicación ácida comentado en el apartado 1.2. Debido a este problema se decidió que el tiempo de operación en batch del primer reactor donde se simuló la fase acidogénica, no podía superar nunca las 24 horas de operación, para obtener así células que no estuvieran afectadas por la ruptura provocada por esta intoxicación.

Las estrategias de arranque utilizadas para cada uno de los experimentos han sido las siguientes:

- En el experimento 1, primeramente se inoculó R1 (10% v/v), y 2 horas después se inoculó R2 (10% v/v). Una vez inoculados ambos reactores se dejó que la planta operara en batch durante 20 horas, periodo tras el cual se activaron las bombas y se comenzó la operación en continuo.
- En el experimento 2 se inocularon ambos reactores a la vez, y 24 horas después se comenzó la operación en continuo.
- En el experimento 3 se inoculó primeramente R2, y 8 horas después se inoculó R1. Una vez inoculados ambos reactores se mantuvieron operando en batch durante 19 horas, y posteriormente se comenzó la operación en continuo.
- En el experimento 4 se decidió emplear el mismo método utilizado en el experimento 3 comentado en el punto anterior.

4. Resultados

4.2.5 Resultados

Experimento 2.1

En las tablas 11, 12, 13 y 14 en el apartado 2.1 del Anexo I se puede observar los resultados de este primer experimento. Se decidió operar durante 120 horas en continuo para triplicar aproximadamente el tiempo de residencia del reactor II (41,6 h). Se inoculó primeramente R1, y dos horas después R2, tal y como se indica en el apartado 4.2.4.

En la tabla 4 se muestran los valores finales de los parámetro más relevantes de este experimento. A continuación se definen algunos de los parámetros empleados:

$$\text{Producción de disolventes} = \text{Flujo utilizado} \cdot \text{Concentración de solventes a la salida de R2}$$

$$\text{Velocidad de consumo de sacarosa} = \text{Flujo utilizado} \cdot (\text{Sacarosa inicial} - \text{Sacarosa a la salida de R2})$$

$$\text{Sacarosa utilizada} = \frac{\text{Sacarosa a la salida de R2}}{\text{Sacarosa inicial}} \cdot 100$$

Todos los valores utilizados para obtener estos parámetros son valores medios calculados a partir de los resultados experimentales.

Parámetro	
Temperatura (°C)	35
Flujo de alimentación (ml/h)	18
Sacarosa a la salida (g/l)	19,59
Solventes totales (g/l)	1,73
Acetona (g/l)	0,32
Butanol (g/l)	1,41
Etanol (g/l)	0,00
A/B/E ratio	18:82:0
Ácidos totales (g/l)	3,01
Ácido acético (g/l)	2,24
Ácido butírico (g/l)	1,12
Velocidad de dilución R1 (h ⁻¹)	0,12
Velocidad de dilución R2 (h ⁻¹)	0,024
Producción de disolventes (g/h)	0,03
Velocidad de consumo de sacarosa (g/h)	0,18
Sacarosa utilizada (%)	34,70

Tabla 4. Parámetros y resultados globales del experimento 2.1.

A continuación se muestra una comparación de varios aspectos entre ambos reactores. Destacar que en todas y cada una de las gráficas que se muestran se indica con una línea vertical el comienzo de la operación en continuo.

4. Resultados

Comportamiento de los solventes

Se muestra en las figuras 19 y 20 una comparación de la evolución de los solventes en ambos reactores.

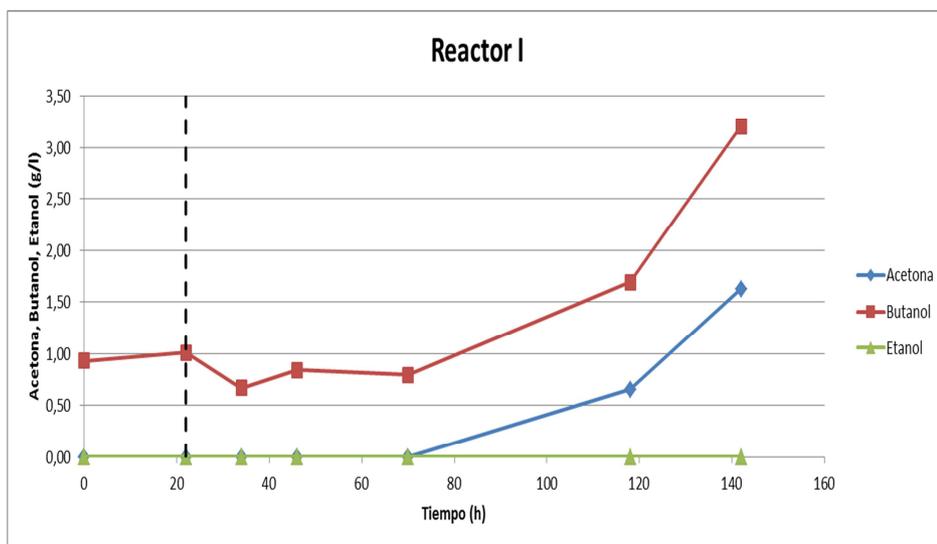


Figura 19. Comportamiento de los disolventes en el reactor I

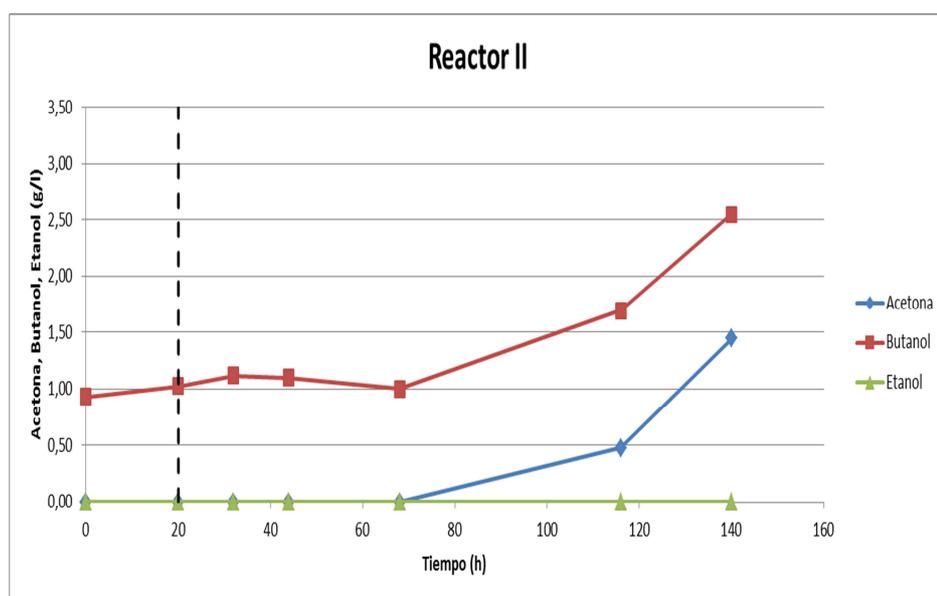


Figura 20. Comportamiento de los solventes en el reactor II

Se puede comprobar que ambos reactores parten con una concentración muy similar de butanol a las 0 h en torno a 1g/l. En las primeras horas la evolución en R2 es positiva, mientras que en R1 alcanza un mínimo de 0,67 g/l. Sin embargo a partir de las 70 horas aproximadamente de experimentación se

4. Resultados

observa como la forma de las curvas se hace idéntica en ambos casos, llegando a un máximo de 3,21 g/l en R1 y de 2,55 g/l en el segundo a las 120 horas.

En el caso de la acetona la situación es ligeramente distinta, ya que en las primeras horas no hay prácticamente acetona en ningún momento. Es a partir de las 70 horas cuando aumenta la concentración de la misma de una manera similar en ambos reactores, llegando a un máximo de 1,63 g/l en R1 y de 1,45 g/l en R2 a las 120 horas.

La concentración de etanol es 0 g/l a lo largo de todo el experimento.

4. Resultados

Sacarosa, solventes y ácidos

En las figuras 21 y 22 se muestra como fue la evolución de la concentración tanto del sustrato como de los productos primarios (ácidos) y secundarios (solventes).

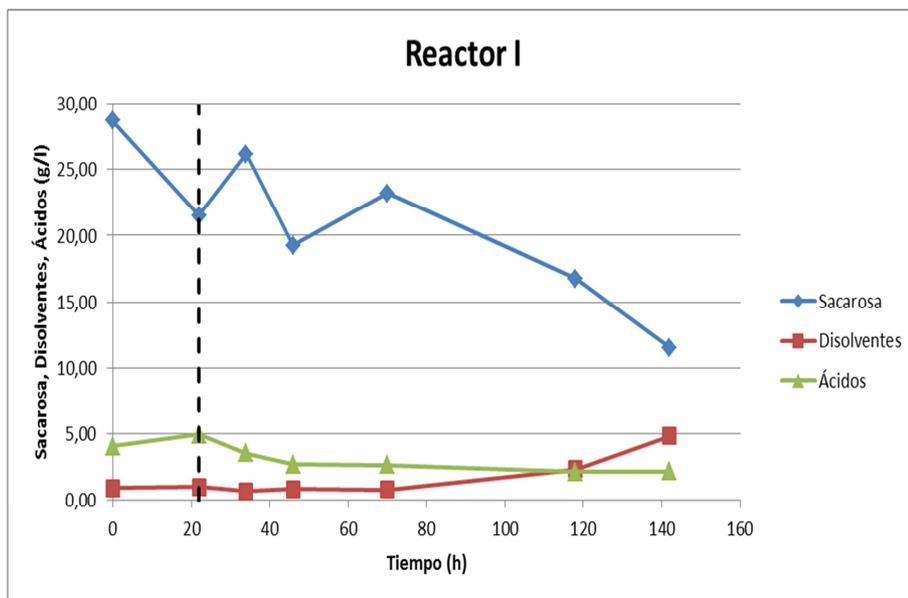


Figura 21. Evolución de la sacarosa, solventes y ácidos en el reactor I

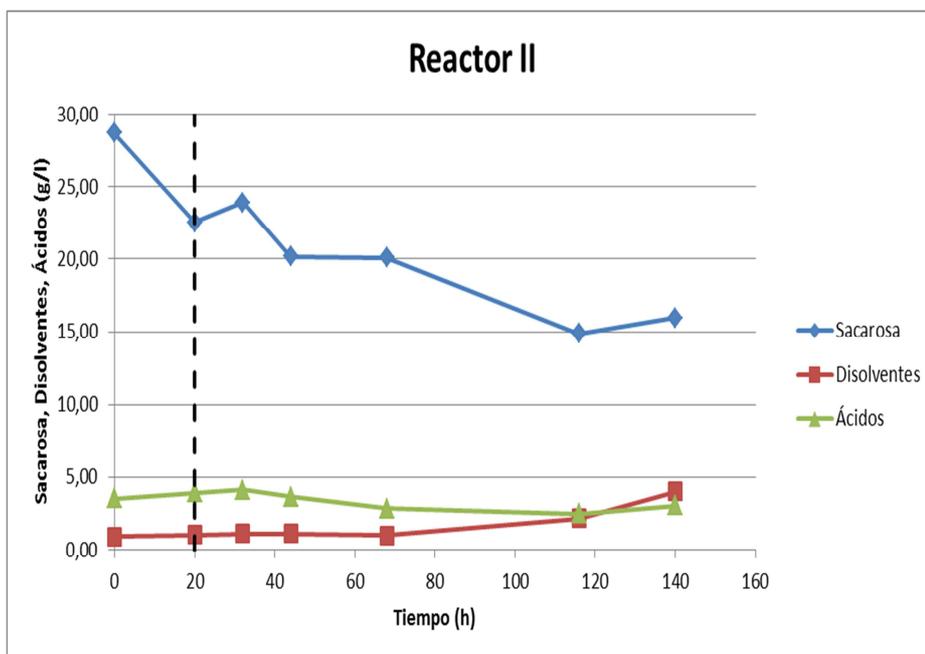


Figura 22. Evolución de la sacarosa solventes y ácidos en el reactor II

4. Resultados

Como se puede observar en ambas gráficas, la evolución de la sacarosa es ligeramente diferente en el segundo reactor donde parece que en torno a las 140 horas se recupera después de alcanzar un mínimo de 15 g/l a las 120 horas aproximadamente.

Debido a la diferencia de tiempo en la inoculación se observa como la cantidad inicial de sacarosa es mayor en el segundo biorreactor en comparación con el primero cuando se arranca la operación en continuo.

La concentración de ácidos (Acético y Butírico) es mayor que la de solventes (Acetona, Butanol y Etanol) durante las 120 primeras horas, y posteriormente se invierte llegando a un máximo de 4,83 g/l de solventes en el primer reactor, y de 4 g/l en el segundo.

4. Resultados

Comportamiento de los ácidos

A continuación se compara en las figuras 23 y 24 el comportamiento de los ácidos (Acético y butírico) en ambos reactores.

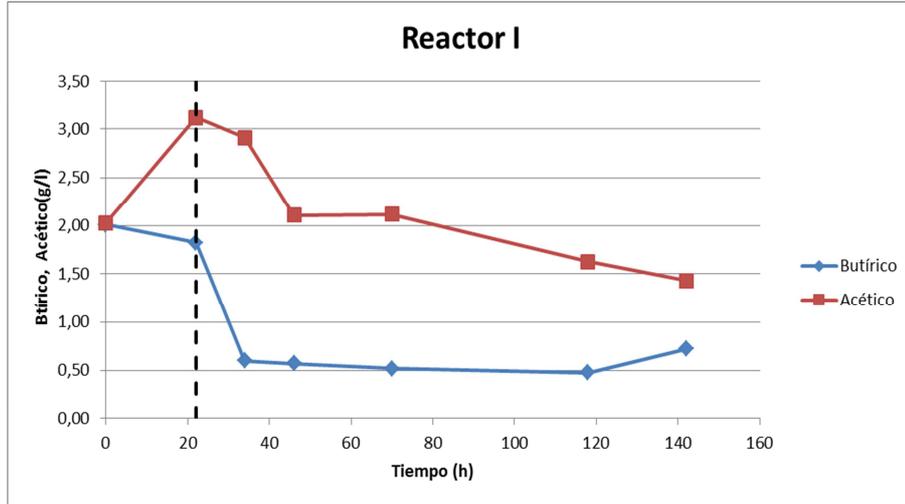


Figura 23. Comportamiento de los ácidos en el reactor I

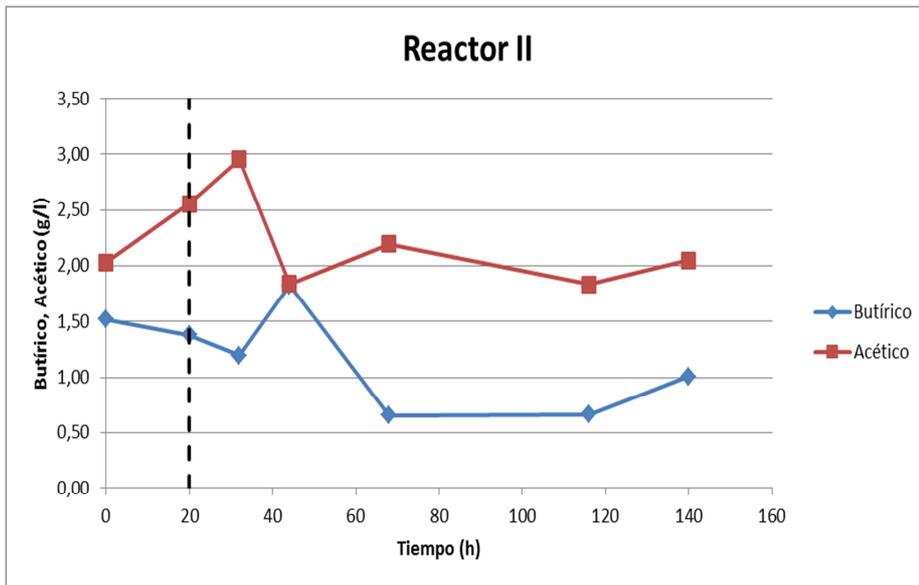


Figura 24. Comportamiento de los ácidos en el reactor II

Como se puede observar en el caso del butírico en ambos reactores, la concentración inicial es al comienzo de la operación de continuo bastante similar, sin embargo en el primer reactor se observa una bajada de concentración del mismo hasta que se estabiliza en torno a 0,5 g/l, mientras que en el segundo la concentración sube hasta un pico de 1,83 g/l a las 48 horas de experimentación para después estabilizarse también en torno a los 0,6 g/l. Finalmente en ambos reactores la concentración de butírico tiende a subir según se llega a las 140 horas.

4. Resultados

En el caso del ácido acético se observa como entorno a las 20 horas la concentración del mismo en el reactor 1 (3,12 g/l) es muy superior a la del reactor 2 (2,56 g/l). Ambos reactores sufren una evolución bastante desigual respecto a la concentración de este ácido, siendo finalmente superior en el caso de R2 (2,05 g/l) que en el caso de R1 (1,43 g/l).

Conclusiones

Como conclusión de este experimento, observando las curvas que describen el comportamiento de los reactores se comprueba cómo no se llegó al régimen estacionario, ya que en el momento en el que se paró el experimento, las concentraciones tanto de ácidos como de disolventes estaban creciendo. Esto se pensó que fue debido a la contaminación del reactor 1, por lo que se decidió repetir el mismo experimento para comprobar si fue así (experimento 2).

Por otro lado respecto a la comparación de los reactores se observa como es solamente en las primeras horas de experimentación en continuo cuando los reactores I y II se comportan de manera diferente. Esto va en contra de lo que cabría esperar, ya que mientras que en el primer reactor es normal que la concentración de ácidos sea superior a la de disolventes, esto no debería ser así en el segundo reactor. Nuevamente se pensó en que la causa de esto podría haber sido la contaminación del experimento, que de alguna manera provocara la desactivación de los microorganismos de cara a la fase solventogénica.

Probablemente debido a esta causa anteriormente citada, el consumo de sacarosa no fue el esperado en el segundo reactor, ya que este se dimensionó de manera que la concentración a la salida de R2 fuera cercana a cero, y se observa en las gráficas como esto no solo no se cumple, si no que al final del experimento la concentración de la misma tiende a crecer.

Respecto al ratio de disolventes, se comprueba cómo se produce mucha más cantidad de butanol que de acetona, y la cantidad de etanol producida es 0 tal y como es característico del microorganismo utilizado. El valor del ratio es algo diferente al esperado, debido principalmente a que la presencia de acetona en las primeras horas de experimentación es nula.

El arranque realizado en este experimento probablemente no sea el más correcto que se pueda realizar, ya que al inocular antes el reactor en el que se va a llevar a cabo la acidogénesis, se provoca que los microorganismos presentes en el segundo reactor se encuentren en una fase más temprana, y no en solventogénesis como así se pretende.

4. Resultados

Experimento 2.2

Debido a la presencia de contaminación en el experimento 1, se decidió realizar este segundo experimento empleando las mismas condiciones de operación que en el primero. Sin embargo se realizaron ciertos cambios en la planta para intentar que las condiciones de esterilización fueran mejores. El cambio principal consistió en la utilización de un biorreactor similar a R2 para almacenar la alimentación, ya que antes se venía haciendo con un bote esterilizable de 1L.

Los resultados de este experimento se pueden consultar en el anexo I, apartado 2.2 en las tablas 15, 16, 17 y 18. La duración de la operación en continuo tal y como se ha comentado es similar a la del experimento 1 (120 h), sin embargo se modificó la manera de inocular ambos reactores, debido a lo comentado en las conclusiones del experimento 1.

En la tabla 5 se muestran los valores finales de los parámetro más relevantes de este experimento.

Parámetro	
Temperatura (°C)	35
Flujo de alimentación (ml/h)	18
Sacarosa a la salida (g/l)	17,07
Solventes totales (g/l)	3,47
Acetona (g/l)	1,43
Butanol (g/l)	2,04
Etanol (g/l)	0,00
A/B/E ratio	41:59:0
Ácidos totales (g/l)	3,72
Ácido acético (g/l)	2,32
Ácido butírico (g/l)	1,40
Velocidad de dilución R1 (h ⁻¹)	0,12
Velocidad de dilución R2 (h ⁻¹)	0,024
Producción de disolventes (g/h)	0,06
Velocidad de consumo de sacarosa (g/h)	0,23
Sacarosa utilizada (%)	43,10

Tabla 5. Parámetros y resultados globales del experimento 2.2

A continuación se muestra una comparación entre distintos aspectos de ambos reactores.

4. Resultados

Comportamiento de los solventes

En las figuras 25 y 26 se puede observar el comportamiento de los disolventes a lo largo de toda el experimento.

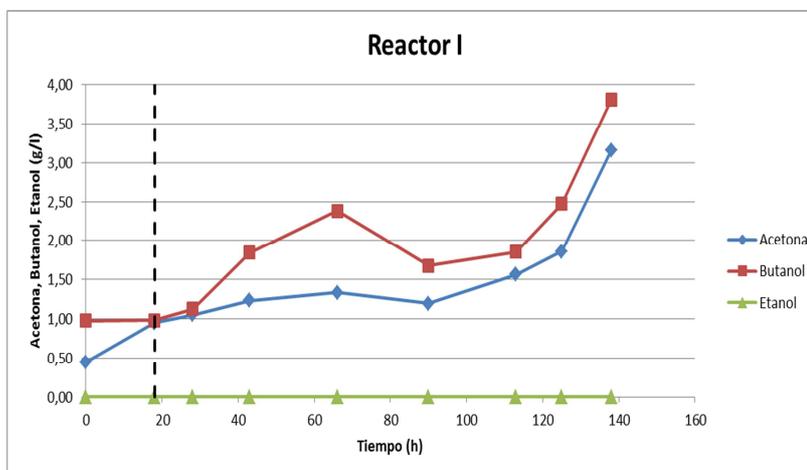


Figura 25. Evolución de los disolventes en el reactor I

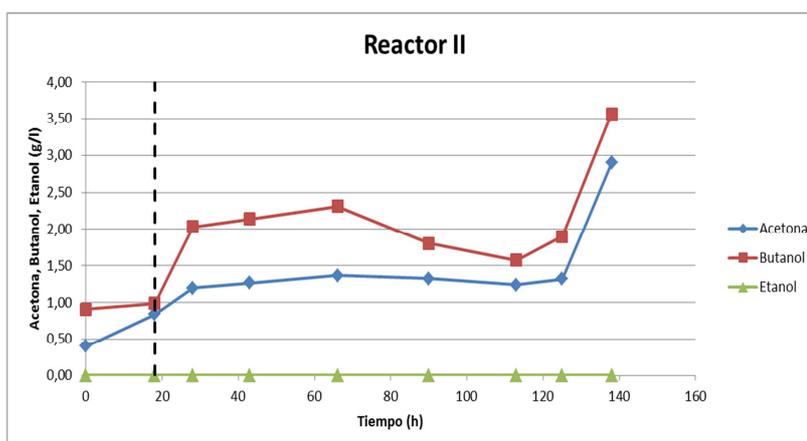


Figura 26. Evolución de los disolventes en el reactor II

Se observa como la concentración de todos los disolventes es muy similar en ambos reactores al comienzo de la experimentación en continuo.

La evolución del butanol es bastante diferente durante las primeras horas de experimentación, pero a partir de entorno a las 70 horas ambos reactores presentan la misma tendencia en cuanto a concentración de butanol. Destacar cómo cuando se llega a las últimas horas de experimentación la concentración se dispara situándose en 3,81 g/l en el primer reactor, y 3,57 g/l en el segundo.

4. Resultados

Respecto a la acetona se observa una evolución similar en ambos reactores, con una concentración siempre por debajo de la del butanol, y con un gran incremento de la misma al en torno a las 140 horas de experimentación, situándose la concentración en 3,16 g/l en el primer reactor, y 2,90 g/l en el segundo.

Por último comentar que tal y como era de esperar la concentración de etanol es 0 g/l en todo momento.

Sacarosa, ácidos y solventes

En las figuras 27 y 28 se muestra la evolución a lo largo del tiempo del sustrato así como de los productos.

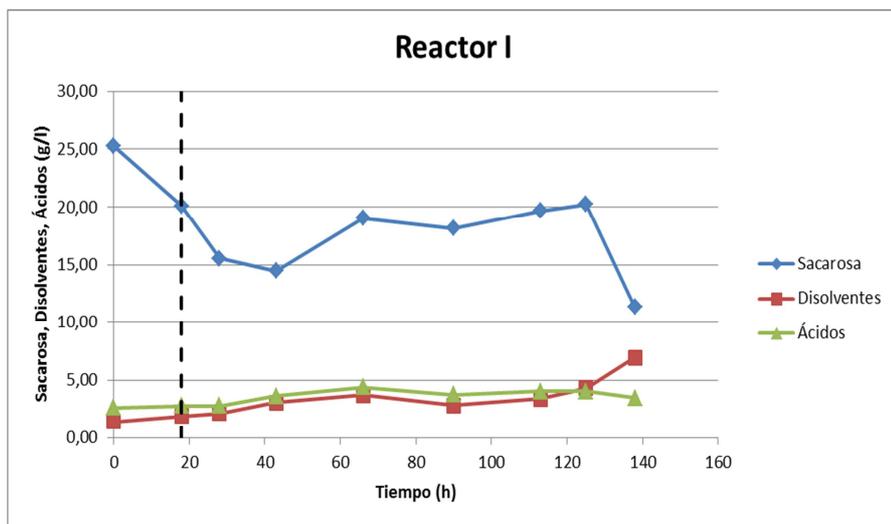


Figura 27. Evolución de la sacarosa ácidos y disolventes en el reactor I

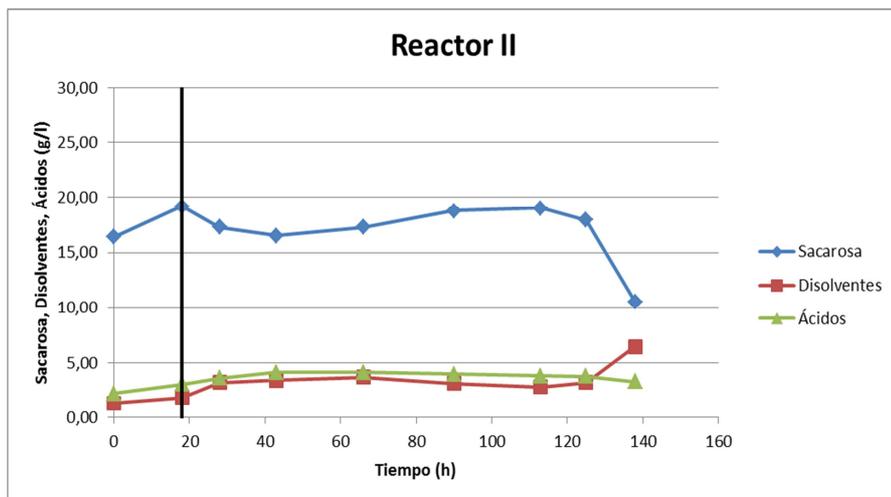


Figura 28. Evolución de la sacarosa ácidos y solventes en el reactor II

4. Resultados

Respecto a la sacarosa se observa como al inicio de la operación en continuo el valor en ambos reactores es bastante similar, situándose en torno a los 20 g/l de concentración. Sorprende sin embargo la crecida de concentración de la misma en el reactor II durante el periodo de batch hasta el inicio del continuo. Se entiende que probablemente sea causa de una mala homogeneización en la primera toma de muestra a las 0 horas.

Destacar como durante la experimentación la concentración de sacarosa tiene un comportamiento bastante similar en ambos reactores, sobre todo a partir de las 70 horas. Según se llega a las 140 horas de operación se observa una caída en la concentración de la misma en ambos reactores hasta valores de 11,34 g/l en R1 y de 10,58 g/l en R2.

Respecto a los ácidos, se observa como su concentración es mayor en todo momento respecto a los disolventes, excepto al final de la operación donde la concentración de solventes crece rápidamente en los dos reactores.

La concentración final de ácidos en el reactor I es de 3,48 g/l, frente a 3,28 g/l en el segundo, y la concentración final de disolventes es de 6,96 g/l en el primer reactor, frente a 6,47 g/l en el segundo.

4. Resultados

Comportamiento de los ácidos

En las figuras 29 y 30 se observa el comportamiento de los ácidos en ambos biorreactores.

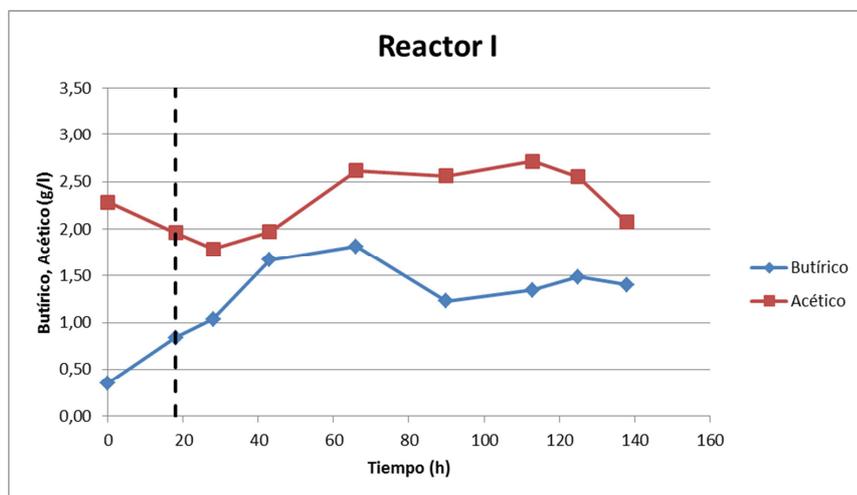


Figura 29. Evolución de los ácidos en el reactor I

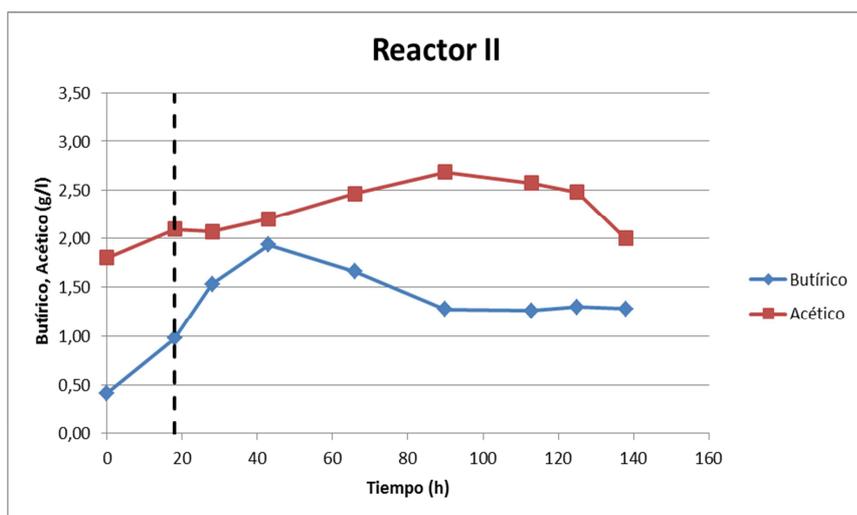


Figura 30. Evolución de los ácidos en el reactor II

En las figuras se observa como al inicio de la operación en continuo las concentraciones de ácidos son bastante similares en ambos reactores, tal y como cabría esperar ya que la inoculación de los mismos se realizó de forma simultánea.

Respecto a la evolución de los mismos se observa como el comportamiento del ácido butírico es muy similar en ambos reactores, estabilizándose sin

4. Resultados

embargo en valores ligeramente superiores en R1 (1,40 g/l) frente a (1,28 g/l) en R2. Además destacar la presencia de un pico en la concentración del mismo en torno a las 66 horas en R1 con un valor de 1,82 g/l, y a las 43 horas en R2 con un valor de 1,93 g/l.

Respecto al ácido acético comentar como al igual que ocurre con el ácido butírico el comportamiento del mismo es muy similar en ambos reactores, con una concentración superior en todo momento respecto al butírico. Al final de la experimentación se observa cómo se produce una bajada de concentración de acético situándose el valor final del mismo en 2,08 g/l en el reactor I, y de 2,00 g/l en el reactor II.

4. Resultados

Conclusiones

De nuevo se observa en este segundo experimento como no se ha llegado hasta un periodo estacionario ya que cuando el experimento se paró se observa en las gráficas como la concentración de disolventes se encontraba creciendo.

Destacar además como en todas las gráficas el comportamiento de los reactores se hace completamente similar sobre todo a partir de las 70 horas de experimentación. Esto no es lo esperado, ya que en el primer reactor es normal que la concentración de ácidos sea superior a la de solventes puesto que se está imitando la fase acidogénica, pero en el segundo reactor donde se imita la fase solventogénica, la concentración de disolventes debería ser muy superior a la de ácidos.

Por otro lado se observa como la concentración de todos los productos en este segundo experimento es bastante mayor que la concentración obtenida de todos y cada uno de ellos en el experimento 1, destacando el comportamiento de la acetona, ya que en el primer experimento la concentración de la misma era nula hasta las 70 horas aproximadamente, y en este segundo experimento las concentración ha sido muy superior en todo momento.

En esta ocasión se observa como el consumo de sacarosa es notablemente mayor respecto a lo observado en el experimento 1, si bien queda lejos aún del valor buscado que debería ser cero. Destacar además que el valor del ratio de disolventes en esta ocasión se encuentra en un valor mucho más parecido al encontrado en la literatura.

Por lo tanto se puede concluir que si bien la contaminación presente en el primer experimento no afectó en cuanto al establecimiento de un régimen estacionario, así como al comportamiento general de los reactores, sí que afectó a la concentración de los productos, y además se aprecia que los cambios introducidos en la planta han ayudado a la disminución de la contaminación así como sus efectos.

Dado que la concentración de disolventes debería ser mucho mayor en el segundo reactor respecto a la concentración de los ácidos, y que según se ha observado en las figuras de este experimento 2 la concentración de los solventes crece de una manera muy significativa al final de la experimentación, se decidió realizar un tercer experimento en el que el tiempo de operación fuera mucho mayor, para comprobar así si el problema procedía de la no operación en régimen estacionario.

4. Resultados

Experimento 2.3

Debido a que si bien se consiguió reducir mucho los niveles de contaminación de la planta, no se consiguieron erradicar por completo, para este experimento se añadieron leves mejoras, destacando la incorporación de un filtro de gases a la salida del nitrógeno. Los componentes utilizados para este experimento son los indicados en la figura 18, ya que se trata de la última modificación realizada a la instalación.

Las condiciones de operación en este experimento son similares a los dos anteriores, en cuanto a temperatura y caudal se refiere. Sin embargo el arranque se realizó inoculando primeramente el reactor 2, y 8 horas después el reactor 1, dejando posteriormente operar en batch durante 18 horas ambos reactores. Así se pretendió que al inicio de la operación en continuo los microorganismos presentes en el reactor 2, se encontraran en una fase de solventogénesis mucho más avanzada que los presentes en el reactor 1.

La duración en este caso también se varió considerablemente debido a lo comentado en las conclusiones del experimento 2.2. De esta manera se dejó operar en continuo a la planta durante 310 horas.

Se pueden encontrar los datos recogidos de este experimento en el anexo I, apartado 2.3 en las tablas 19, 20, 21 y 22.

A continuación, en la tabla 6 se muestra un resumen de los parámetros finales más importantes.

Parámetro	
Temperatura (°C)	35
Flujo de alimentación (ml/h)	18
Sacarosa a la salida (g/l)	16,10
Solventes totales (g/l)	2,92
Acetona (g/l)	1,00
Butanol (g/l)	1,97
Etanol (g/l)	0,00
A/B/E ratio	34:66:0
Ácidos totales (g/l)	3,91
Ácido acético (g/l)	2,32
Ácido butírico (g/l)	1,59
Velocidad de dilución R1 (h ⁻¹)	0,12
Velocidad de dilución R2 (h ⁻¹)	0,024
Producción de disolventes (g/h)	0,05
Velocidad de consumo de sacarosa (g/h)	0,25
Sacarosa utilizada (%)	46,30

Tabla 6. Parámetros y resultados globales del experimento 2.2

4. Resultados

A continuación se muestra el comportamiento de ambos reactores a lo largo del tiempo y se comparan desde diversos puntos.

Comportamiento de los disolventes

En las figuras 31 y 32 se muestra cual ha sido la concentración de acetona, butanol y etanol a lo largo de la experimentación.

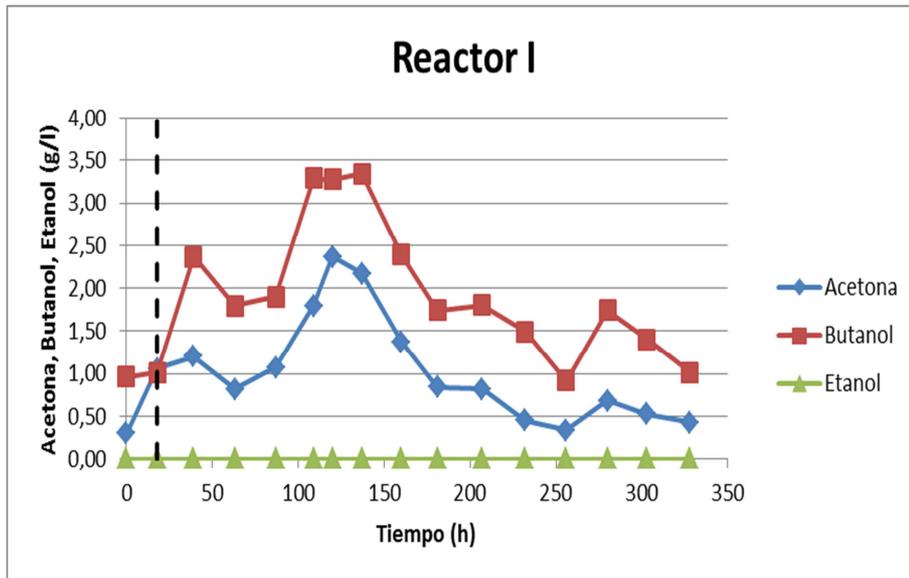


Figura 31. Evolución de los disolventes en el reactor I.

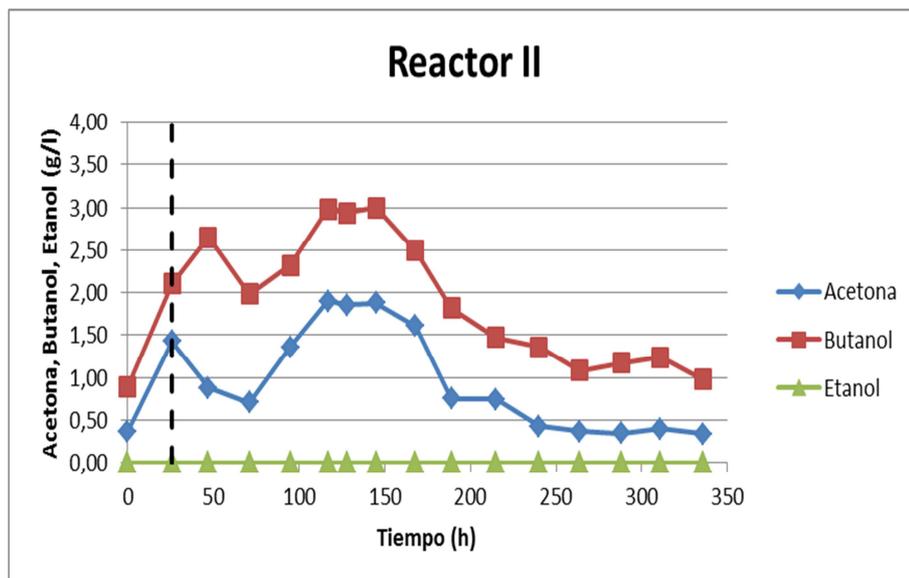


Figura 32. Evolución de los disolventes en el reactor II

4. Resultados

En el caso del butanol se puede observar como la concentración al iniciar la operación en continuo es prácticamente del doble en el caso del reactor II (2,11 g/l) frente a la concentración del reactor I (1,01 g/l).

A partir de aquí el comportamiento en ambos reactores se hace de nuevo muy similar, resaltando la presencia de un máximo de 3,35 g/l en el primer reactor a las 137 horas de operación, y de 3,00 g/l en el reactor II a las 145 horas.

Una vez superado el máximo, se observa como la concentración de butanol disminuye en ambos reactores hasta situarse en un periodo más o menos estacionario de las 250 horas sobre todo en el segundo reactor. La concentración medida en ambos reactores al finalizar el experimento ha sido de 1,01 g/l en el caso del reactor I y de 0,98 g/l en el caso del reactor II.

Respecto a la acetona la situación es muy similar, de nuevo se observa como la concentración es notablemente superior en el segundo reactor al inicio del continuo, pero sin embargo el comportamiento a partir de ahí es el mismo en ambos reactores.

La acetona también presenta un máximo de concentración en ambos reactores con un valor de 2,37 g/l a las 120 horas en el primer reactor, y de 1,90 g/l a las 117 horas en el segundo reactor.

Finalmente en ambos reactores se observa como la concentración de acetona llega a un estado estacionario con un valor cercano a 0,5 g/l en el primer reactor, y de 0,35 g/l en el segundo.

Respecto a la concentración de etanol, destacar que tal y como era de esperar es 0 g/l a lo largo de toda la experimentación.

4. Resultados

Sacarosa, ácidos y solventes

En las figuras 33 y 34 se puede observar la concentración de sacarosa ácidos y solventes a lo largo del tiempo.

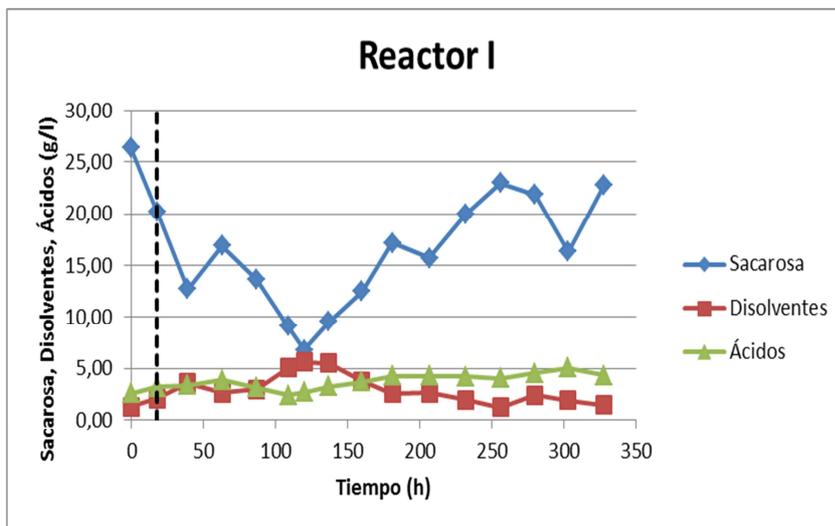


Figura 33. Evolución de la sacarosa ácidos y solventes en el reactor I

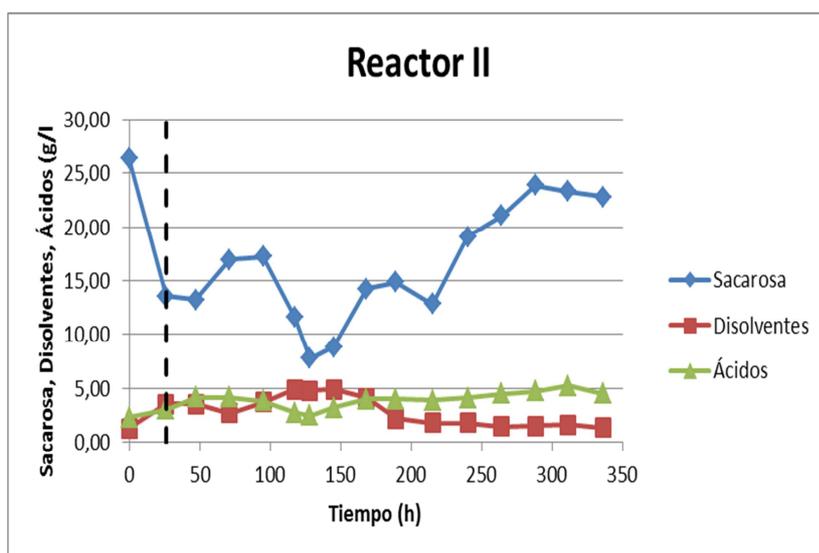


Figura 34. Evolución de la sacarosa ácidos y solventes en el reactor II

De las figuras mostradas destaca el hecho de que al comienzo de la operación en continuo la concentración de sacarosa es bastante superior en el reactor 1 (20,24 g/l) que en el reactor 2 (13,59 g/l), tal y como se esperaba al haber inoculado mucho antes el reactor 2 que el 1.

4. Resultados

Respecto a la evolución de la sacarosa se observa como en ambos casos sigue un patrón similar. Primeramente se ve cómo se llega a un mínimo de concentración en las primeras horas de continuo, 6,79 g/l en R1 y 7,78 g/l en R2, para luego recuperarse y posteriormente dar lugar a un nuevo mínimo mucho mayor en torno a las 120 horas de operación en continuo. Destacar que justo en este momento la concentración de disolventes es máxima por su parte. Después la concentración de sacarosa se va recuperando progresivamente a lo largo del tiempo hasta que llega a un periodo estacionario en ambos reactores en torno a las 300 horas de operación, con un valor de 22,81 g/l para el reactor 1 y de 22,82 g/l para el reactor 2.

Respecto a los ácidos y disolventes, destacar que la concentración de los ácidos es siempre superior a la de los disolventes en ambos reactores, excepto cuando el nivel de sacarosa presenta el mínimo previamente mencionado, momento en el cual la concentración de disolventes crece mucho, mientras que la de ácidos disminuye considerablemente.

Después del máximo, la concentración de ácidos vuelve a ser superior a la de disolventes, y ambos entran en un estado estacionario a partir de las 250 horas aproximadamente con valores en torno a 4,5 g/l en el caso de los ácidos en el reactor I, y en el reactor II, y 1,9 g/l en el caso de los disolventes para el reactor I, y 1,5 g/l para el reactor II.

4. Resultados

Comportamiento de los ácidos

En las figuras 35 y 36 se puede observar cual ha sido el comportamiento del ácido acético y del ácido butírico a lo largo de toda la experimentación.

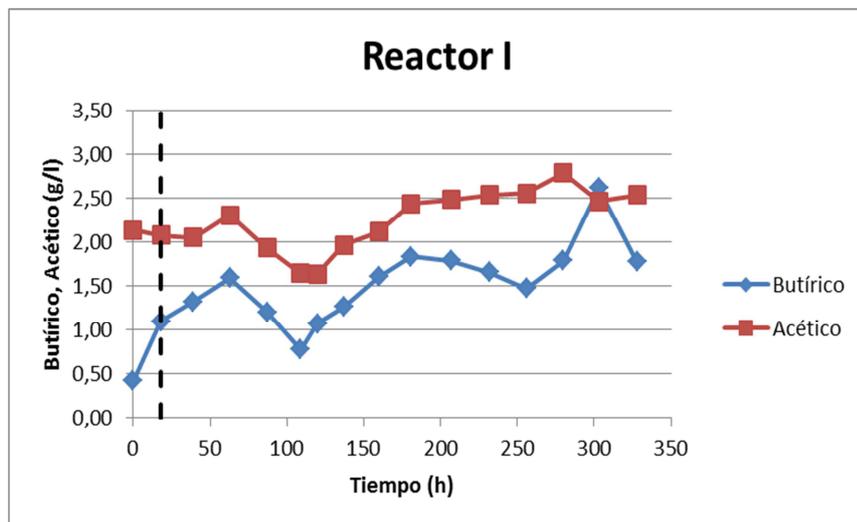


Figura 35. Evolución de los ácidos en el reactor I

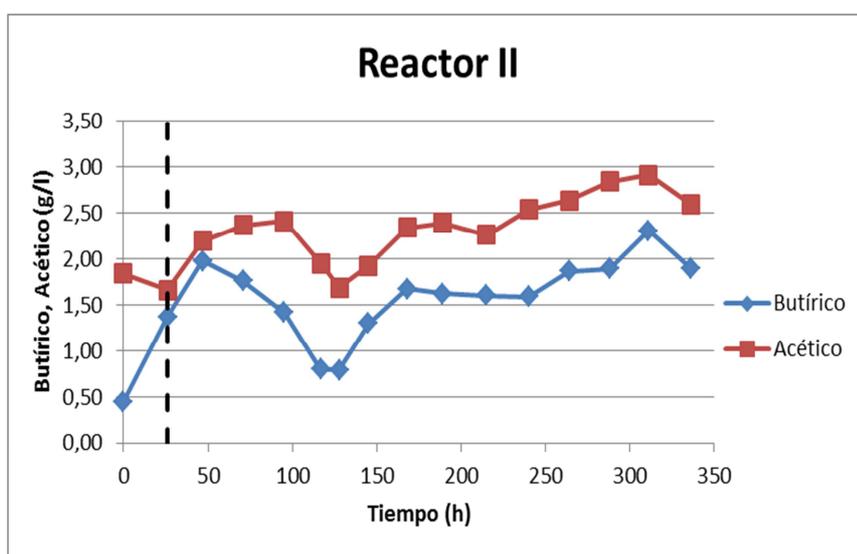


Figura 36. Evolución de los ácidos en el reactor II

En el caso del ácido butírico destacar como su concentración es muy superior en el caso del reactor II respecto al reactor I al comienzo de la operación en continuo. Posteriormente se observa como en ambos reactores sigue un patrón muy similar de comportamiento, presentando un mínimo de

4. Resultados

concentración en torno a las 125 horas de operación, que coincide con el máximo previamente mencionado de concentración de disolventes.

Una vez superado dicho mínimo la concentración en ambos reactores se recupera, siendo siempre inferior a la concentración de acético, y presentando un valor al final de la experimentación de 1,78 g/l en el primer reactor, y de 1,90 g/l en el segundo.

En el caso del acético la situación es similar, destacando que en esta ocasión al inicio de la operación en continuo la concentración es ligeramente superior en el reactor I (2,08 g/l), frente a 1,67 g/l del segundo reactor.

Cuando el experimento se completó la concentración en el primer reactor fue de 2,54 g/l, y la del segundo reactor de 2,60 g/l.

4. Resultados

Conclusiones

En este tercer experimento se ha comprobado cómo se consigue al fin llegar al estado estacionario de la planta tras aproximadamente 250 horas de experimentación.

Se observa sin embargo como el comportamiento de los reactores vuelve a ser exactamente el mismo en todos los aspectos comparados, pese a que se realizó la inoculación con 8 horas de diferencia entre ambos reactores, y que la concentración al inicio de la operación en continuo es la esperada en todos los casos.

Esto sugiere que por alguna razón los microorganismos del segundo reactor se desactivan a las pocas horas de comenzar la operación en continuo, ya que se ha encontrado en la bibliografía (47), que el comportamiento del primer reactor es el correcto, ya que presenta los picos de sacarosa, ácidos y disolventes en los tiempos correctos, y además el consumo de sacarosa es muy bajo en el segundo reactor, tal y como se puede comprobar en las figuras mostradas.

Por lo tanto una vez comprobado que el comportamiento del primer reactor es el correcto, se ha de investigar cual es la causa de que en el segundo reactor la concentración de los disolventes sea tan pequeña y menor que la de los ácidos.

Respecto a este problema debido a la persistente contaminación del tanque de alimentación, se analizó la composición del mismo tras unas horas de experimentación comprobando la presencia de butanol y del resto de los productos en el mismo. Esto indica que los microorganismos estarían retrocediendo desde el primer reactor hasta el tanque de alimentación, lo que puede provocar un grave desajuste, ya que los microorganismos que se encuentran en el primer reactor ya no tienen que estar en una fase acidogénica prematura, pudiendo incluso estar en fase solventogénica y finalmente muertos al llegar al segundo biorreactor, o ya sin actividad celular.

Este problema está principalmente causado debido a los bajos flujos que se han tenido que emplear a lo largo de la experimentación para cumplir con la velocidad de dilución calculada.

Se piensa por otro lado que la opción de arranque escogida para este tercer experimento es la más adecuada, ya que se ha comprobado como en todo momento los microorganismos se hallan en una fase de crecimiento más avanzada en el segundo reactor, que es lo que se busca.

4. Resultados

Experimento 2.4

Debido a que el comportamiento de los reactores, así como el producto obtenido no ha sido el esperado, se decidió realizar un cuarto experimento en el que se escogió como parámetro de diseño la velocidad de dilución calculada a partir de los experimentos realizados en discontinuo ($0,06 \text{ h}^{-1}$) en lugar de la correspondiente a la bibliografía encontrada (0.12 h^{-1}).

En esta ocasión no se realizó ninguna modificación a la planta a mayores de las ya comentadas. Por otro lado dado que a partir de los experimentos anteriores se comprobó como el mejor método de arranque era el que se llevó a cabo en el experimento 3, se decidió repetirlo. Por lo tanto se inoculó primeramente el reactor 2, y 8 horas más tarde el reactor 1, ambos con un 10 % v/v de microorganismos. Posteriormente se dejó ambos reactores trabajar en batch durante 19 horas, y finalmente se inició la operación en continuo.

Se utilizaron las mismas condiciones de operación excepto el flujo de las bombas que se redujo a 9 ml/h para así respetar la velocidad de dilución calculada. En este caso se operó en continuo durante 246 horas.

En las tablas 23, 24, 25 y 26 del apartado 2.4 del anexo I se pueden encontrar los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación, y en la tabla 7 se muestra un resumen de los parámetros más destacados de este experimento.

Parámetro	
Temperatura (°C)	35
Flujo de alimentación (ml/h)	9
Sacarosa a la salida (g/l)	16,10
Solventes totales (g/l)	1,27
Acetona (g/l)	0,41
Butanol (g/l)	0,86
Etanol (g/l)	0,00
A/B/E ratio	47:53:0
Ácidos totales (g/l)	2,79
Ácido acético (g/l)	2,07
Ácido butírico (g/l)	0,72
Velocidad de dilución R1 (h^{-1})	0,06
Velocidad de dilución R2 (h^{-1})	0,012
Producción de disolventes (g/h)	0,007
Velocidad de consumo de sacarosa (g/h)	0,25
Sacarosa utilizada (%)	46,30

Tabla 7. Parámetros y resultados generales del experimento 2.4

4. Resultados

A continuación se muestra la evolución de la concentración de los distintos productos, así como del sustrato empleado tal y como se ha hecho para los experimentos anteriores.

Evolución de los disolventes

En las figuras 37 y 38 se muestra cómo ha ido evolucionando la concentración de los distintos disolventes presentes en el medio de fermentación a lo largo del tiempo.

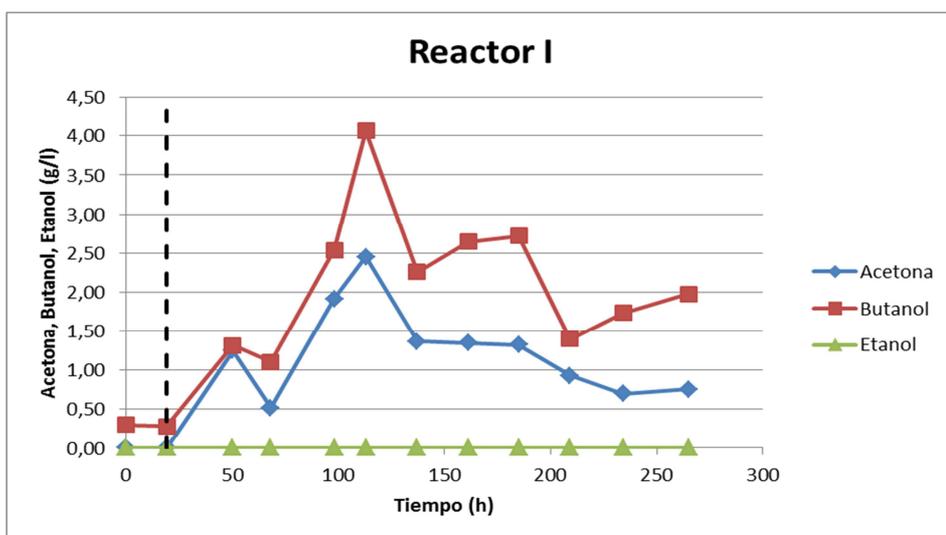


Figura 37. Evolución de los disolventes en el reactor I

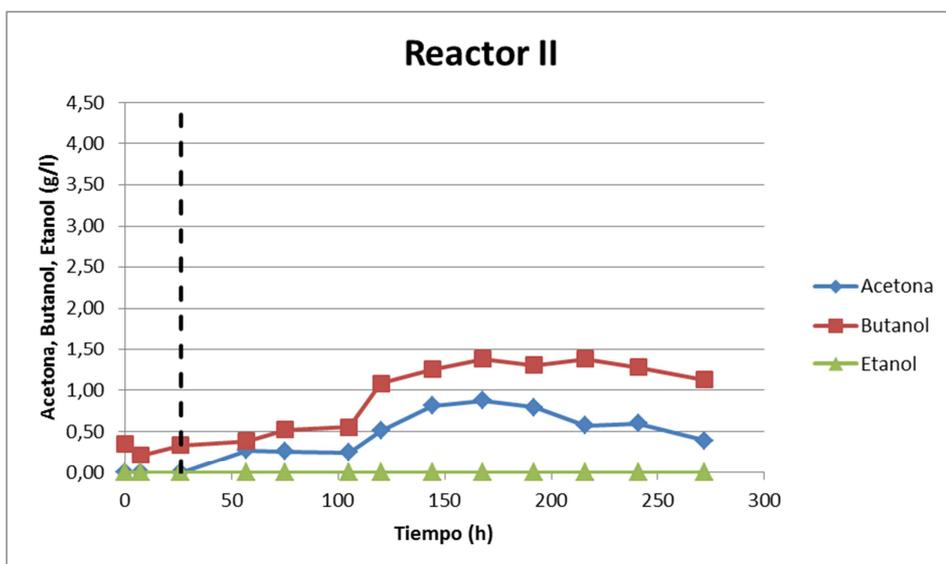


Figura 38. Evolución de los disolventes en el reactor II

4. Resultados

De las figuras anteriores se puede apreciar que la concentración de butanol evoluciona de manera diferente en ambos reactores. En el primero de ellos crece hasta alcanzar un pico de concentración de 4,07 g/l a las 113 horas, para después oscilar levemente y situarse al final de la experimentación en un valor de 1,98 g/l. Por otro lado en el reactor II se observa como el butanol mantiene una concentración prácticamente constante durante las primeras 100 horas, y es a partir de este momento donde asciende hasta estabilizarse en valores que se encuentran entre 1 y 1,5 g/l.

Respecto a la acetona, al igual que ocurre con el butanol presenta una evolución muy diferente en ambos reactores, destacando como siempre su concentración es inferior a la de butanol. En el primer reactor sigue una pauta muy similar a lo comentado en el punto anterior presentando un máximo de 2,45 g/l a las 113 horas y 0,76 g/l al finalizar el experimento. En el reactor II una vez más comprobamos como la evolución de la concentración de acetona es similar a la de butanol manteniéndose esta en valores cercanos a 1 g/l durante las horas centrales del experimento y situándose en un valor de 0,39 g/l al parar el mismo.

Por último el etanol tal y como era de esperar mantiene una concentración de 0 g/l a lo largo de todo el experimento en ambos reactores.

4. Resultados

Sacarosa, ácidos y solventes

Se muestra en las figuras 39 y 40 cuál ha sido la evolución en la concentración de sacarosa, así como de los disolventes y de los ácidos en general.

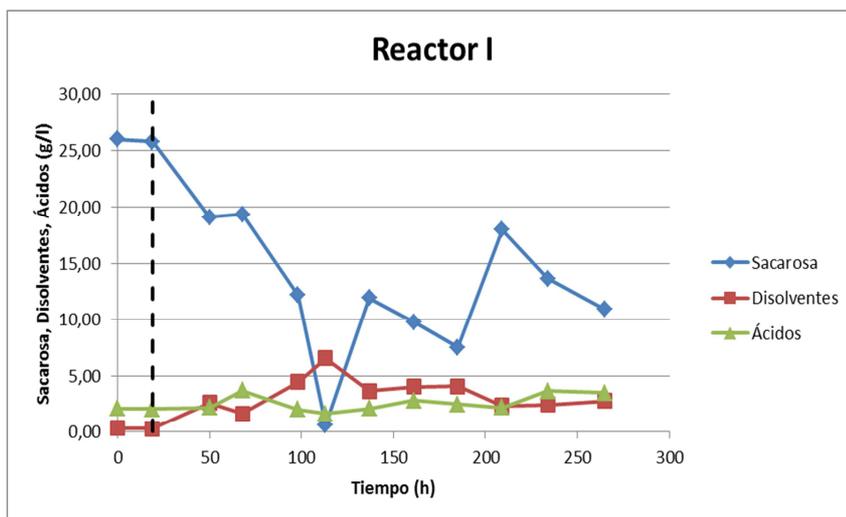


Figura 39. Evolución de la sacarosa, ácidos y solventes en el reactor I.

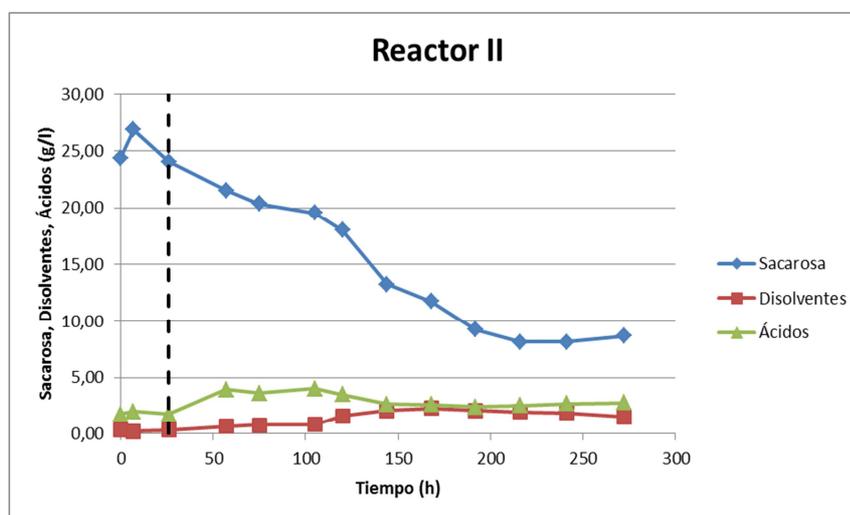


Figura 40. Evolución de la sacarosa, ácidos y solventes en el reactor II.

Respecto a la sacarosa se observa como en el reactor I la concentración evoluciona de manera decreciente hasta alcanzar un mínimo de 0,61 g/l a las 113 horas, momento en el cual la concentración de butanol y acetona era

4. Resultados

máxima. Posteriormente crece hasta situarse tras un breve periodo de oscilación en 10,93 g/l al finalizar el experimento. En el reactor II se puede observar como el comportamiento de la sacarosa es total mente diferente, destacando como su valor decrece de manera continua desde que se inicia la operación en continuo hasta alcanzar 8,69 g/l al parar la planta.

En el primer reactor los ácidos mantienen valores superiores a los disolventes excepto entre las 75 y 200 horas aproximadamente. Tal y como se explicó en las conclusiones del experimento 2.3 esta evolución es característica del biorreactor donde ocurre la acidogénesis en la operación en continuo. Por otro lado encontramos en el reactor II como los disolventes presentan una concentración muy inferior a la de ácidos sobre todo en las primeras horas, después se observa como prácticamente ambas concentraciones se igualan y se vuelven a separar ligeramente en las últimas horas del experimento, siendo de nuevo mayor la concentración de ácidos 2,78 g/l frente a 1,59 g/l de disolventes.

4. Resultados

Evolución de los ácidos

Se muestra en las figuras 41 y 42 la evolución de la concentración del ácido butírico y del ácido acético a lo largo de todo el experimento.

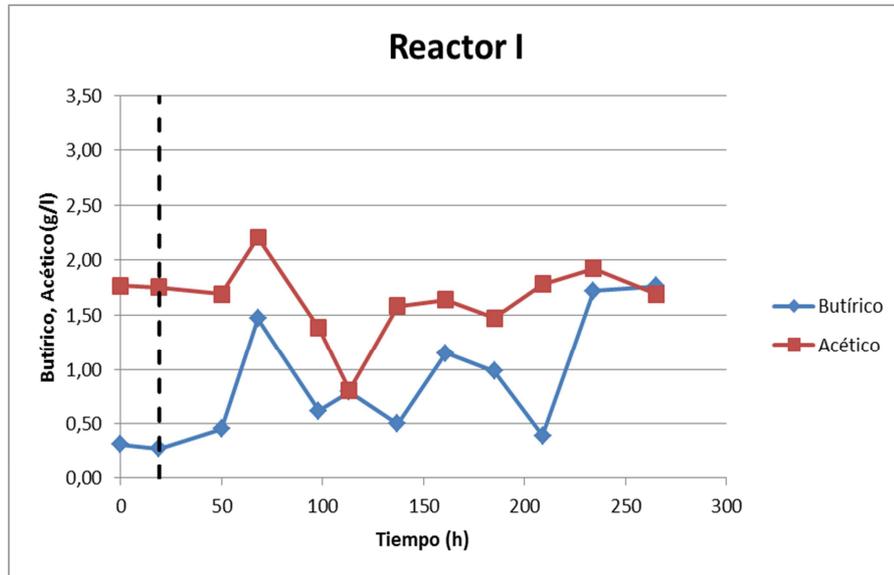


Figura 41. Evolución de los ácidos en el reactor I

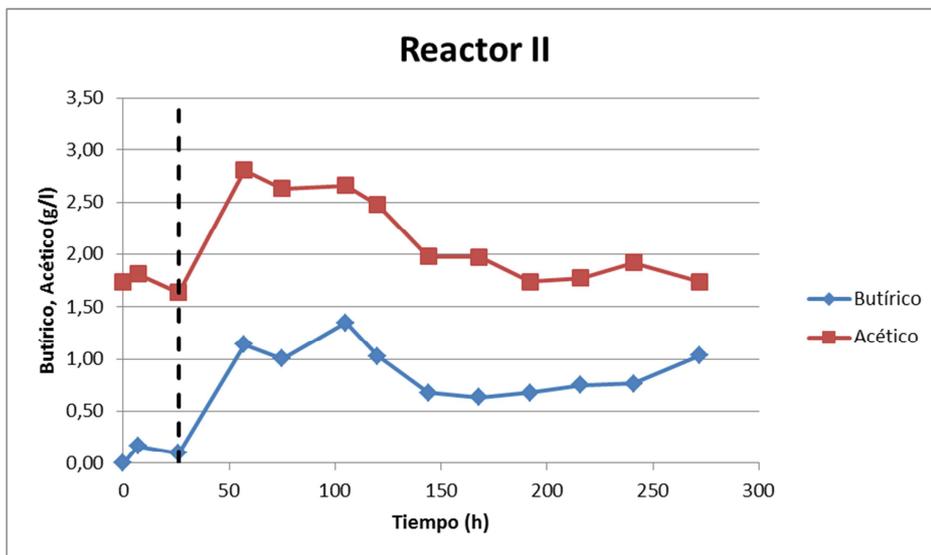


Figura 42. Evolución de los ácidos en el reactor II

En este caso se observa como la concentración de butírico es prácticamente siempre inferior a la de acético en ambos reactores, pero sin embargo su

4. Resultados

evolución a lo largo del tiempo es muy diferente. En el reactor I se observa como la concentración no para de oscilar durante toda la experimentación estableciéndose un valor al final del mismo que se encuentra levemente por encima de la concentración de acético 1,76 g/l frente a 1,69 g/l de acético. En el reactor II por su parte la concentración de butírico comienza evoluciona de manera creciente hasta aproximadamente las 100 horas de experimentación, presentando un máximo de 1,35 g/l. Destacar que justo en este periodo es cuando la concentración de butanol comenzaba a subir. A partir de este instante la concentración de la misma decrece hasta en las horas finales ascender nuevamente y establecerse en un valor de 1,04 g/l al final del experimento.

El acético muestra una evolución muy parecida respecto a la de butírico en ambos reactores, presentando un valor de 1,69 g/l al final del experimento en el reactor I, y 1,74 en el reactor II.

4. Resultados

Conclusiones

En este experimento se ha observado como el comportamiento de los reactores ya no es el mismo tal y como sucedía en los otros tres experimentos. Se entiende que esto es debido a la disminución de la velocidad de dilución en el primer reactor. Se ha podido comprobar como en el primer reactor se lleva a cabo la acidogénesis de manera exitosa presentando valores de concentración de ácidos superiores a los de disolventes, pero sin embargo en el segundo reactor pese a que la evolución de los disolventes es la esperada su concentración es muy baja a lo largo de todo el experimento.

A la luz de los resultados se ha comprobado la importancia del cálculo de la velocidad máxima de dilución utilizando el mismo sustrato y medio que se empleará posteriormente en la operación en continuo.

Se piensa que el comportamiento mostrado por los reactores en los experimentos anteriores era provocado por un lavado del primer reactor que impedía que los microorganismos presentes en el mismo alcanzaran el suficiente estado de madurez para ejercer correctamente su función el reactor II.

Por otro lado hay que tener en cuenta que la concentración de disolventes aún es muy baja en el segundo reactor, por lo que una velocidad de dilución aún menor del primer reactor podría provocar que esta aumentara significativamente.

Además otra posible causa de la misma puede ser el retroceso de los microorganismos del primer reactor al tanque de alimentación tal y como se comentó en las conclusiones del experimento 2.3. Además hay que destacar que concretamente en este experimento la cantidad de microorganismos presentes en el tanque de alimentación se ha visto incrementada, debido posiblemente a que los flujos utilizados son todavía menores a los que se emplearon en experimentos anteriores. Por lo tanto para evitar este problema se propone la utilización de biorreactores con un volumen útil superior de manera que se puedan emplear flujos mayores sin que la velocidad de dilución se vea afectada.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Como conclusión a los diferentes objetivos propuestos para este Trabajo Fin de Grado:

1. De los experimentos en realizados en discontinuo se determinó que la concentración óptima a utilizar era de 30 g/l de sacarosa, y una vez conocido esto se calculó que la velocidad máxima de crecimiento era de 0.06 h^{-1} para el medio utilizado.
2. Para el diseño de una planta piloto-laboratorio, y el dimensionado de los biorreactores presentes en la misma, se ha utilizado primeramente para ciertos experimentos un valor de velocidad máxima de dilución determinada a partir de la bibliografía (0.12 h^{-1}), observando como el comportamiento de los reactores no era el esperado, ya que no se conseguía imitar correctamente las fases metabólicas del microorganismo.
Posteriormente se utilizó el valor deducido a partir de los experimentos en discontinuo realizados (0.06 h^{-1}) comprobando como en esta ocasión, si bien las concentraciones de productos no eran excesivamente altas, se conseguía que los biorreactores se comportaran de una manera mucho más cercana a lo esperado.
3. En lo que al arranque de la planta en continuo respecta, se ha comprobado cómo resulta mucho más conveniente la inoculación primeramente del reactor en el que se trata de imitar la solventogénesis, y posteriormente con unas horas de diferencia aquél en el que se trata de imitar la acidogénesis. De esta manera se consigue que cuando se inicia la operación en continuo los microorganismos se encuentren ya en la fase idónea para llevar a cabo la fermentación.
Si bien es cierto que en este proyecto únicamente se ha experimentado con una diferencia en tiempos de inoculación de 8 horas, por lo que probablemente deba ensayarse otra diferencia que permita un mejor comportamiento en general.
4. Respecto a la viabilidad de la operación, destacar que desde el punto de vista de la robustez del experimento la planta piloto diseñada no ha presentado problema alguno, excepto el retroceso de los microorganismos presentes en el reactor que se puede corregir con un mayor flujo tal y como se ha comentado. Sería conveniente además, implementar entre el depósito de alimentación y el primer reactor una unidad de pasteurización para evitar problemas de contaminación

5. Conclusiones

Respecto a las concentraciones obtenidas, a la luz de los resultados se piensa que una velocidad de dilución menor de 0.06 h^{-1} podría ser suficiente para obtener una concentración mayor de butanol, ya que la utilizada es justamente la máxima posible tal y como se ha demostrado. Sin embargo, se alcanzaría una menor producción de disolventes.

En cuanto al tiempo necesario para llegar a la operación en régimen estacionario con las condiciones de operación empleadas, se ha concluido que se debe operar al menos 250 horas tal y como se deduce de los resultados.

Como conclusión general es necesario indicar que si bien no se han obtenido completamente los resultados esperados, el microorganismo *Clostridium beijerinckii* sí que ha sido capaz de llevar a cabo la fermentación ABE en continuo durante un periodo importante de tiempo sin observarse en ningún momento una desactivación del mismo.

Si bien cabe comentar que la operación con dos biorreactores colocados en serie no ha sido fructífera, obteniendo en todo momento concentraciones muy bajas de butanol, con valores muy cercanos a 1 g/l frente a $4,30 \text{ g/l}$ que se podrían alcanzar en los experimentos realizados en discontinuo; este hecho indica que debe seguir profundizándose en el desarrollo de nuevas estrategias de operación que posibiliten una adecuada optimización del proceso de fermentación.

6. Bibliografía

6. Bibliografía

1. *Acetone-Butanol Fermentation Revisited*. **Woods, David T. Jones and David R.** 1986, Microbiological Reviews, págs. 484-524.
2. *Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using Clostridium beijerinckii: Part I-Batch fermentation*. **Nasib Qureshi, Badal C. Saha, Michael A.Cotta.** 32, 2007, Elsevier, págs. 168-175.
3. *Acetone-butanol-ethanol (ABE) production by Clostridium beijerinckii from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates*. **Carolina Bellido, Marina Loureiro Pinto, Mónica Coca, Gerardo González-Benito, María Teresa García-Cubero.** 167, 2014, Elsevier, págs. 198-205.
4. **Kajeew K. Sukumaran, Lalitha Devi Gottumukkala, Kuniparambil Rajasree, Deepthy Alex, Ashok Pandey.** Butanol Fuel from Biomass: Revisiting ABE Fermentation. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. 2011, págs. 571-585.
5. *Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems*. **Petra Patakova, Michaela Linhova, Mojmir Rychtera, Leona Paulova, Karel Melzoch.** 2012, Biotechnology Advances, págs. 1-10.
6. **Syed, Dra. Miss Quratulain.** *Biochemical studies on anaerobic fermentation of molasses by Clostridium Acetobutylicum* . 1994.
7. *Comparative economic assessment of ABE fermentation based on cellulosic and non-cellulosic feedstocks*. **Manish Kumar, Yogesh Goyal , Abhijit Sarkar, Kalyan Gayen.** 93, 2012, Applied Energy, págs. 193-204.
8. *Inhibition of butyric acid fermentation by carbon monoxide*. **Kubowitz, F.** 274, 1934, Biochem.Z., págs. 285-294.
9. **Wood, W. A.** Fermentation of carbohydrates and related compounds. *The bacteria, vol 2*. New York : Academic Press, Inc, 1961, págs. 54-149.
10. *Uptake and activation of acetate and butyrate in Clostridium acetobutylicum*. **Hartmanis, M. G. N., T. Klason, and S. Gatenbeck.** 20, 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol, págs. 66-71.
11. *Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum grown in continuous culture*. **Bahl, H., W. Andersch, K. Braun, and G. Gottschalk.** 14, 1982, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., págs. 17-20.
12. *Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in Clostridium acetobutylicum P262*. **Long, S., D. T. Jones, and D. R. Woods.** 20, 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol., págs. 256-261.

6. Bibliografía

13. *Purification and role of phosphotransbutyrylase*. **Valentine, R. C., and R. S. Wolfe**. 235, 1960, J. Biol. Chem., págs. 1948-1956.
14. *Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by Clostridium acetobutylicum*. **Andersch, W., H. Bahl, and G. Gottschalk**. 18, 1983, Eur. J. Appl. Microbiol., págs. 327-332.
15. *Mechanism of the butyl alcohol fermentation with heavy carbon acetic and butyric acids and acetone*. **Wood, H. G., R. W. Brown, and C. H. Werkman**. 6, 1945, Arch. Biochem., págs. 243-261.
16. *Mechanism of the acetone formation by Clostridium acetobutylicum*. **Matta-El-Amouri, G., R. Janati-Idrissi, O. Assobhei, H. Petitdemange, and R. Gay**. 30, 1985, FEMS Microbiol. Lett., págs. 11-16.
17. *Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control*. **Si-Yu Li, Ranjan Srivastava, Steven L. Suib, Yi Li, Richard S. Parnas**. 102, 2011, Bioresource Technology, págs. 4241-4250.
18. acetona. [En línea] [Citado el: 2015 de Abril de 18.] <http://acetona.org/>.
19. **Bailey, Kristen**. ehowenespanol.com. [En línea] Demand Media, Inc., 1999. [Citado el: 18 de Abril de 2015.] http://www.ehowenespanol.com/usos-comunes-acetona-quimica-info_203421/.
20. **INCHEM (International Programme on Chemical Safety)**. *Acetone*. Paris : s.n., 1999.
21. **IPCS (International Programme on Chemical Safety)**. *Fichas Internacionales de Seguridad Química (acetona)*. 2009.
22. **Quiminet**. Quiminet. [En línea] 3 de Febrero de 2012. [Citado el: 5 de Julio de 2015.] <http://www.quiminet.com/articulos/el-uso-de-la-acetona-en-las-industrias-2675666.htm>.
23. **Química Delta**. Química Delta . [En línea] 2010. [Citado el: 5 de Julio de 2015.] [http://www.quidelta.com.mx/Productos-Servicios/Mercados/Intermediarios-Quimicos/Monomero-de-Metil-Metacrilato-\(MMA\)](http://www.quidelta.com.mx/Productos-Servicios/Mercados/Intermediarios-Quimicos/Monomero-de-Metil-Metacrilato-(MMA)).
24. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**. Mayo Clinic. [En línea] 21 de Mayo de 2013. [Citado el: 5 de Julio de 2015.] <http://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/expert-answers/bpa/faq-20058331>.
25. **INCHEM (International Programme on Chemical Safety)**. *n-Butyl Alcohol*. Berna : s.n., 2001.
26. **INSHT (Instituto Nacional de Seguridad Higiene y Trabajo)**. *BUTAN-1-OL*. 2005.

6. Bibliografía

27. **INSHT (Instituto Nacional de Higiene y Salud en el Trabajo)**. *Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del acrilato de n-butilo*. 2009.
28. **INCHEM (International Programme on Chemical Safety)**. *Ethanol*. 2004.
29. **IPCS (International Programme on Chemical Safety)**. *Fichas Internacionales de Seguridad Química (etanol)*. 2005.
30. **Guevara, Ana Lucía Canahuí**. *Comparación de la capacidad bactericida del alcohol etílico 95%, amonio cuaternario y pvp iodine como ingredientes activos de los desinfectantes por el método del coeficiente fenólico*. Guatemala : Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009.
31. **New Jersey department of health and senior services**. *Hoja informativa sobre sustancias peligrosas: acetato de etilo*. 1996.
32. **Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México**. *HOJA DE SEGURIDAD XI ETER ETILICO*.
33. *Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using Clostridium beijerinckii: Part II-Fed-batch fermentation*. **Nasib Qureshi, Badal C. Saha, Michael A.Cotta**. 32, 2007, Elsevier, págs. 176-183.
34. **Vázquez-Contreras, Dr. Edgar**. Bioquímica y biología molecular en línea. [En línea] Comité asesor de publicaciones. Facultad de Medicina, UNAM, 15 de Octubre de 2003. [Citado el: 3 de Junio de 2015.] <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/regulacion%20expresion%20genes2.html>.
35. *Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicate-silicone composite membrane from fed-batch reactor of Clostridium acetobutylicum*. **Qureshi, N., Meagher, M.M., Huang, J., Hutkins, R.W.** 187, 2001, Journal of Membrane Science, págs. 93-102.
36. *Studies on the stability of solvent production by Clostridium acetobutylicum in continuous cuulture*. **Stephens, G.M., Holt, R., Gottschal, J., Morris, J.** 58, 1985, J. Appl. Microbiol, págs. 597-605.
37. *Conditions promoting stability of solventogenesis or culture degeneration in continuous fermentations of Clostridium acetobutylicum*. **Baarbeau, J.Y., Marchal, R., Vandesastele, J.P.,** 1988. 29, 1988, Appl. Microbiol. Biotechnol, págs. 447-455.
38. *Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two-stage phohate limited chemostat*. **Bahl, H., Andersch, W., Gottshalk, G.** 15, 1982, Appl. Microbiol, Biotechnol., págs. 201-205.

6. Bibliografía

39. *Separation techniques in butanol production: Challenges and developments*. **Niloofer Abdehagh, F. Handan Tezel, Jules Thibault**. 60, 2013, Biomass and bioenergy, págs. 222-246.
40. *ABE fermentation products recovery methods—A review*. **Anna Kujawska, Jan Kujawski, Marek Bryjak, Wojciech Kujawski**. 48, 2015, Renewable and Sustainable Energy Reviews, págs. 648-661.
41. *Butanol recovery from fermentations by liquid-liquid extraction and membrane solvent extraction*. **Groot WJ, Soedjak HS, Donck PB, Vanderlans R, Luyben K, Timmer JMK**. 5, 1990, Bioprocess Eng, págs. 203–216.
42. *Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation —relief of product inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation*. **Qureshi N, Maddox S, Friedl A**. 8, 1992, Biotechnol Prog, págs. 382–390.
43. *Extraction and pertraction of phenol through bulk liquid membranes*. **Cichy W, Schlosser S, Szymanowski J**. 80, 2005, J Chem Technol Biotechnol, págs. 189-197.
44. *Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis*. **Garcia A, Lannotti EL, Fischer JL**. 18, 1986, Biotechnol Bioeng, págs. 785-791.
45. **PAYO, MARÍA DEL CARMEN GARCÍA**. Tesis Doctoral. DESTILACIÓN EN MEMBRANAS DE DISOLUCIONES ACUOSAS DE ALCOHOLES. Madrid : s.n., 1998.
46. *Integrated butanol recovery for an advanced biofuel: current state and prospects*. **Sun, Chuang Xue & Jing-Bo Zhao & Li-Jie Chen & Feng-Wu Bai & Shang-Tian Yang & Jian-Xin**. 98, 2014, Microbiol Biotechnol, págs. 3463–3474.
47. *Continuous Two-Stage ABE-Fermentation using Clostridium beijerinckii NRRL B592 Operating with a Growth Rate in the First Stage Vessel Close to its Maximal Value*. **O. Mutschlechner, H. Swoboda, J.R. Gapes**. 1, 2000, J. Mol. Microbiol. Biotechnol, págs. 101-105.

ANEXO I

1. Experimentación en discontinuo

Experimento 1.1

Sustrato: Sacarosa 60 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: No

Control de pH: sí (4.5)

Tiempo (h)	X (g/l)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	0,62	60,87	1,35	0,00	1,35
24	2,6	54,58	0,90	1,12	2,02
42	3,16	28,54	1,42	2,44	3,86
48	2,92	24,63	1,26	2,47	3,73
66	2,95	21,28	1,20	2,33	3,53
72	3,17	20,36	1,33	2,57	3,90
90	3,01	11,66	1,24	1,42	2,66
96	2,59	8,88	1,10	1,09	2,19
114	2,56	7,12	1,15	1,16	2,31
120	1,48	6,73	1,23	1,31	2,54

Tabla 8. Resultados experimento 1.1.

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,00	0,00	0,00	0,00
24	1,68	3,26	0,00	4,94
42	2,91	5,30	0,00	8,21
48	3,12	5,85	0,32	9,29
66	3,31	5,85	0,30	9,46
72	3,60	6,21	0,28	10,09
90	4,06	6,98	0,49	11,53
96	4,56	7,67	0,57	12,80
114	4,16	7,56	0,69	12,41
120	4,36	7,60	0,60	12,56

Tabla 9. Resultados experimento 1.1 continuación.

Anexo I

Experimento 1.2

Sustrato: Sacarosa 30 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: No

Control de pH: sí (4.5)

Tiempo (h)	Sustrato (g/l)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)
0	30,00	0,00	0,00	0,00
10	25,00	0,24	0,79	0,00
20	15,00	0,50	1,50	0,00
24	10,00	1,50	2,75	0,00
42	3,00	2,00	3,50	0,00
48	2,00	2,25	3,75	0,25
66	2,00	2,60	4,20	0,30
72	2,00	2,50	4,30	0,25
96	0,00	2,25	4,15	0,25
120	0,00	2,10	3,75	0,25

Tabla 10. Resultados experimento 1.2 continuación.

2. Experimentación en continuo

Experimento 2.1

Sustrato: Sacarosa 30 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: No

Control de pH: No

Flujo: 0.3 ml/min

Reactor I

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Acidos (g/l)
0	28,69	2,03	2,01	4,04
22	21,50	3,12	1,83	4,95
34	26,16	2,92	0,60	3,52
46	19,27	2,11	0,57	2,68
70	23,21	2,12	0,52	2,64
118	16,75	1,63	0,48	2,11
142	11,53	1,43	0,72	2,15

Tabla 11. Resultados experimento 2.1 Reactor I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,00	0,93	0	0,93
22	0,00	1,01	0,00	1,01
34	0,00	0,67	0,00	0,67
46	0,00	0,84	0,00	0,84
70	0,00	0,80	0,00	0,80
118	0,66	1,69	0,00	2,35
142	1,63	3,21	0,00	4,83

Tabla 12. Resultados experimento 2.1 Reactor I continuación

Reactor II

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	28,71	2,03	1,52	3,55
20	22,54	2,56	1,38	3,94
32	23,91	2,96	1,20	4,15
44	20,20	1,84	1,83	3,67
68	20,10	2,20	0,66	2,85
116	14,87	1,84	0,67	2,50
140	15,96	2,05	1,01	3,06

Tabla 13. Resultados experimento 2.1 Reactor II

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,00	0,93	0,00	0,93
20	0,00	1,03	0,00	1,03
32	0,00	1,12	0,00	1,12
44	0,00	1,10	0,00	1,10
68	0,00	1,00	0,00	1,00
116	0,48	1,69	0,00	2,17
140	1,45	2,55	0,00	4,00

Tabla 14. Resultados experimento 2.1 Reactor II continuación.

Experimento 2.2

Sustrato: Sacarosa 30 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: Si

Control de pH: No

Flujo: 0.3 ml/min

Reactor I

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	25,30	2,28	0,35	2,64
18	20,14	1,96	0,84	2,80
28	15,55	1,79	1,04	2,82
43	14,48	1,97	1,67	3,64
66	19,07	2,62	1,82	4,43
90	18,19	2,56	1,23	3,79
113	19,72	2,72	1,35	4,06
125	20,27	2,55	1,49	4,04
138	11,34	2,08	1,40	2,08

Tabla 15. Resultados experimento 2.2 Reactor I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,45	0,97	0,00	1,42
18	0,95	0,98	0,00	1,93
28	1,05	1,13	0,00	2,18
43	1,24	1,84	0,00	3,08
66	1,33	2,38	0,00	3,71
90	1,19	1,68	0,00	2,87
113	1,57	1,85	0,00	3,42
125	1,86	2,47	0,00	4,33
138	3,16	3,81	0,00	6,96

Tabla 16. Resultados experimento 2.2 Reactor I continuación.

Reactor II

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Acidos (g/l)
0	16,39	1,80	0,41	2,22
18	19,18	2,09	0,98	3,07
28	17,29	2,07	1,54	3,61
43	16,52	2,20	1,93	4,13
66	17,29	2,46	1,66	4,12
90	18,79	2,69	1,28	3,96
113	19,01	2,57	1,26	3,83
125	17,93	2,48	1,30	3,78
138	10,58	2,00	1,28	3,28

Tabla 17. Resultados experimento 2.2 Reactor II

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,40	0,90	0,00	1,30
18	0,84	0,99	0,00	1,83
28	1,20	2,04	0,00	3,23
43	1,26	2,14	0,00	3,40
66	1,36	2,31	0,00	3,67
90	1,32	1,81	0,00	3,13
113	1,24	1,58	0,00	2,82
125	1,32	1,90	0,00	3,22
138	2,90	3,57	0,00	6,47

Tabla 18. Resultados experimento 2.2 Reactor II continuación

Experimento 2.3

Sustrato: Sacarosa 30 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: Si

Control de pH: No

Flujo: 0.3 ml/min

Reactor I

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	20,24	2,08	1,10	3,18
21	12,76	2,05	1,32	3,37
45	16,90	2,31	1,59	3,90
69	13,66	1,93	1,20	3,13
91	9,13	1,65	0,78	2,42
102	6,79	1,64	1,07	2,71
119	9,57	1,97	1,27	3,23
142	12,54	2,12	1,61	3,73
163	17,21	2,44	1,83	4,27
189	15,73	2,49	1,79	4,27
214	19,95	2,54	1,65	4,19
238	22,98	2,56	1,47	4,03
262	21,88	2,79	1,79	4,58
285	16,33	2,47	2,62	5,08
310	22,81	2,54	1,78	4,32

Tabla 19. Resultados experimento 2.3 Reactor I

Anexo I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	1,06	1,01	0,00	2,07
21	1,20	2,37	0,00	3,57
45	0,82	1,80	0,00	2,61
69	1,07	1,90	0,00	2,97
91	1,79	3,30	0,00	5,09
102	2,37	3,28	0,00	5,65
119	2,17	3,35	0,00	5,52
142	1,38	2,39	0,00	3,77
163	0,84	1,74	0,00	2,58
189	0,82	1,81	0,00	2,62
214	0,45	1,50	0,00	1,94
238	0,34	0,92	0,00	1,25
262	0,68	1,74	0,00	2,42
285	0,52	1,41	0,00	1,93
310	0,42	1,01	0,00	1,43

Tabla 20. Resultados experimento 2.3 Reactor I continuación

Reactor II

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	13,59	1,67	1,38	3,04
21	13,25	2,20	1,98	4,18
45	16,97	2,37	1,76	4,13
69	17,27	2,41	1,42	3,83
91	11,68	1,96	0,80	2,76
102	7,78	1,69	0,79	2,48
119	8,85	1,93	1,30	3,23
142	14,24	2,34	1,68	4,02
163	14,88	2,40	1,62	4,02
189	12,84	2,26	1,61	3,87
214	19,10	2,54	1,59	4,13
238	21,07	2,64	1,87	4,51
262	23,88	2,84	1,89	4,73
285	23,33	2,92	2,31	5,23
310	22,82	2,60	1,90	4,50

Tabla 21. Resultados experimento 2.3 Reactor II

Anexo I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	1,43	2,11	0,00	3,54
21	0,88	2,66	0,00	3,53
45	0,71	1,99	0,00	2,69
69	1,36	2,32	0,00	3,68
91	1,90	2,99	0,00	4,89
102	1,85	2,94	0,00	4,79
119	1,88	3,00	0,00	4,88
142	1,61	2,50	0,00	4,11
163	0,75	1,82	0,00	2,18
189	0,74	1,47	0,00	1,82
214	0,43	1,36	0,00	1,79
238	0,36	1,08	0,00	1,44
262	0,35	1,18	0,00	1,52
285	0,40	1,24	0,00	1,64
310	0,34	0,98	0,00	1,31

Tabla 22. Resultados experimento 2.3 Reactor II Continuación

Anexo I

Experimento 2.4

Sustrato: Sacarosa 30 g/l

Condiciones: anaerobias

Adición de antiespumante: Si

Control de pH: No

Flujo: 0.15 ml/min

Reactor I

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Acidos (g/l)
0	25,98	1,77	0,32	2,08
19	25,77	1,75	0,28	2,03
50	19,09	1,69	0,46	2,15
68	19,36	2,21	1,47	3,67
98	12,18	1,38	0,62	2,00
113	0,61	0,81	0,80	1,61
137	11,92	1,58	0,50	2,08
161	9,76	1,64	1,15	2,79
185	7,51	1,47	0,99	2,46
209	17,98	1,78	0,40	2,18
234	13,66	1,92	1,72	3,64
265	10,93	1,69	1,76	3,45

Tabla 23. Resultados experimento 2.4 Reactor I

Anexo I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,00	0,30	0,00	0,30
19	0,00	0,29	0,00	0,29
50	1,25	1,32	0,00	2,57
68	0,52	1,11	0,00	1,62
98	1,92	2,54	0,00	4,45
113	2,45	4,07	0,00	6,52
137	1,37	2,26	0,00	3,63
161	1,35	2,65	0,00	4,00
185	1,33	2,72	0,00	4,04
209	0,93	1,40	0,00	2,33
234	0,70	1,74	0,00	2,43
265	0,76	1,98	0,00	2,73

Tabla 24. Resultados experimento 2.4 Reactor I continuación

Reactor II

Tiempo (h)	Sacarosa (g/l)	Acético (g/l)	Butírico (g/l)	Ácidos (g/l)
0	24,31	1,74	0,00	1,74
7	26,83	1,82	0,17	1,98
26	24,06	1,64	0,10	1,73
57	21,53	2,81	1,14	3,95
75	20,37	2,63	1,01	3,64
105	19,55	2,66	1,35	4,01
120	18,02	2,48	1,03	3,51
144	13,27	1,98	0,68	2,66
168	11,75	1,98	0,64	2,61
192	9,25	1,74	0,68	2,42
216	8,15	1,78	0,75	2,53
241	8,16	1,92	0,77	2,69
272	8,69	1,74	1,04	2,78

Tabla 25. Resultados experimento 2.4 Reactor II

Anexo I

Tiempo (h)	Acetona (g/l)	Butanol (g/l)	Etanol (g/l)	Disolventes (g/l)
0	0,00	0,36	0,00	0,36
7	0,00	0,21	0,00	0,21
26	0,00	0,34	0,00	0,34
57	0,28	0,39	0,00	0,67
75	0,26	0,53	0,00	0,79
105	0,25	0,56	0,00	0,81
120	0,51	1,09	0,00	1,60
144	0,82	1,26	0,00	2,07
168	0,88	1,38	0,00	2,26
192	0,79	1,30	0,00	2,09
216	0,58	1,38	0,00	1,96
241	0,60	1,28	0,00	1,88
272	0,39	1,13	0,00	1,52

Tabla 26. Resultados experimento 2.4 Reactor II Continuación