



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS HORTOFRUTÍCOLAS MEDIANTE EL  
DESARROLLO DE PROCESOS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE  
2,3-BUTANODIOL**

Autor: Adrián Mateo Martínez

Tutores: Mónica Coca Sanz

Juan Carlos López Linares

Valladolid, julio 2022



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

**MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS HORTOFRUTÍCOLAS MEDIANTE EL  
DESARROLLO DE PROCESOS DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE  
2,3-BUTANODIOL**

Autor: Adrián Mateo Martínez

Tutores: Mónica Coca Sanz

Juan Carlos López Linares

Valladolid, julio 2022

## RESUMEN

El 2,3-butanodiol (2,3-BD) es un compuesto tradicionalmente obtenido por vía petroquímica que se emplea en múltiples industrias tanto como materia prima como aditivo. Sin embargo, existen numerosos estudios que demuestran que hay muchos microorganismos capaces de producirlo de una manera más sostenible, mediante la fermentación de residuos orgánicos. Este TFM se ha centrado en su obtención empleando *Paenibacillus polymyxa* e hidrolizados de residuos hortofrutícolas como sustrato, en particular hidrolizado de destrío de zanahoria. Además, se ha estudiado el comportamiento del microorganismo utilizando diferentes monosacáridos como sustrato (disoluciones modelo de glucosa, fructosa y galactosa, tanto por separado como en mezclas).

Para optimizar el proceso de fermentación estudiado en este TFM se han analizado algunas variables como han sido el medio de crecimiento del microorganismo, la velocidad de agitación durante la fermentación y el tiempo óptimo de operación, utilizando como respuestas la concentración de 2,3-BD, el rendimiento y la productividad. En cuanto al medio de crecimiento se han realizado ensayos de fermentación con glucosa usando el medio *Häßler* y el medio *Okonkwo*, ofreciendo mejores resultados el primero (concentración máxima de 19 g/L de 2,3-BD y productividad de 0,37 g/(L·h)). También se han utilizado distintas velocidades de agitación, 100, 200 y 300 rpm, con las que se han obtenido resultados que respaldan las referencias bibliográficas: una mayor velocidad de agitación supone un consumo de azúcares más rápido, menores tiempos de operación, pero también una mayor producción de acetoína, un subproducto del proceso. En cuanto a los tiempos de operación, todos los ensayos han tenido sus resultados óptimos entre las 24 y 72 h. La valorización de estos residuos mediante la obtención de 2,3-BD es una alternativa viable, pero aún necesita más desarrollo e investigación.

**PALABRAS CLAVE:** 2,3-butanodiol, *P. polymyxa*, fermentación, zanahoria, residuos.

## ABSTRACT

2,3butanediol (2,3-BD) is a compound traditionally obtained by petrochemical ways, used in multiple industries both as a raw material and as an additive. However, there are multiple researches that show that there are many microorganisms capable of producing it in a more sustainable way, through the fermentation of organic wastes. This TFM has focused on its production using *Paenibacillus polymyxa* and hydrolyzed fruit and vegetable waste as substrate, in particular hydrolyzed carrot waste. In addition, the behavior of the microorganism using synthetic monosaccharides (glucose, fructose and galactose, both separately and in mixtures) has been studied.

In order to optimize the fermentation process studied in this TFM, some variables have been analyzed such as the composition of the growth medium, the stirring speed during fermentation and the optimum operation time. Regarding the growth medium, glucose fermentation trials have been carried out using *Häßler* medium and *Okonkwo* médium, getting better results with the first one (maximum

concentration of 19 g/L of 2,3-BD and productivity of 0.37 g/(L-h)). Different stirring speeds were also used, 100, 200 and 300 rpm, obtaining results that support the bibliographic references: higher agitation speed means faster sugar consumption, shorter operation times, but also higher production of acetoin, a by-product. In terms of operation times, all the trials have had their optimum results between 24 and 72 h. The recovery of these wastes by obtaining 2,3-BD is a viable alternative, but still needs further development and research

**KEYWORDS:** 2,3-buthanediol, *P. polymyxa*, fermentation, carrot, waste.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. <i>2,3-BD: Características, aplicaciones y síntesis química.</i> .....	1
1.2. <i>Bioprocesos para la producción de 2,3-Butanodiol: estado del arte.</i> .....	4
1.2.1. RUTA METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS.....	4
1.2.2. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE 2,3-BD .....	5
1.2.3. MATERIAS PRIMAS Y MEDIO DE FERMENTACIÓN.....	7
1.2.4. BIORREACTORES .....	9
1.2.5. PARÁMETROS DE PROCESO .....	12
1.3. <i>Residuos hortofrutícolas para la obtención de bioproductos.</i> .....	19
1.3.1. VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE ZANAHORIA .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
3.1. <i>Microorganismo y condiciones de cultivo</i> .....	23
3.1.1. ACTIVACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO .....	23
3.1.2. CRECIMIENTO DEL INÓCULO .....	23
3.2. <i>Fermentaciones en régimen discontinuo.</i> .....	25
3.3. <i>Métodos analíticos.</i> .....	26
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	26
4.1. <i>Selección del medio de crecimiento.</i> .....	27
4.2. <i>Fermentaciones con medios modelo de azúcares.</i> .....	31
4.2.1. FERMENTACIONES USANDO FRUCTOSA COMO SUSTRATO .....	31
4.2.2. FERMENTACIONES USANDO GALACTOSA COMO SUSTRATO .....	33
4.2.3. FERMENTACIONES USANDO DISOLUCIONES DE AZÚCARES .....	35
4.3. <i>Fermentaciones con hidrolizado de zanahoria.</i> .....	37
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	41
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> De izquierda a derecha: (2S,3S)-2,3-butanodiol; (2R,3R)-2,3-butanodiol; meso-2,3-butanodiol.....	1
<b>Figura 1.2.</b> Diagrama de bloques de la producción industrial del 2,3-BD siguiendo un proceso químico de craqueo del crudo de petróleo.....	3
<b>Figura 1.3.</b> Ruta metabólica para la producción de 2,3-BD.....	5
<b>Figura 3.1.</b> Crioviales con stock de microorganismo con glicerol al 40%.....	20
<b>Figura 4.1.</b> Evolución de (A) consumo de glucosa en medio Häßler, (B) consumo de glucosa en medio Okonkwo, (C) producción de 2,3-BD en medio Häßler, (D) producción de 2,3-BD en medio Okonkwo, (E) producción de acetoína en medio Häßler, y (F) producción de acetoína en medio Okonkwo en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando <i>P. polymyxa</i> . Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada); 110g/L (asterisco azul); 130 g/L (círculo verde).....	26
<b>Figura 4.2.</b> Relación entre (A) la producción de 2,3-BD y (B) el consumo de azúcares en tanto por ciento frente a la concentración inicial de glucosa.....	28
<b>Figura 4.3.</b> Evolución de (A) consumo de fructosa, (B) producción de 2,3-BD, (C) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando <i>P. polymyxa</i> y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada); 110g/L (asterisco azul); 130 g/L (círculo verde).....	30
<b>Figura 4.4.</b> Evolución de (A) consumo de galactosa, (B) producción de 2,3-BD, (C) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando <i>P. polymyxa</i> y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada) .....	32
<b>Figura 4.5.</b> Evolución de (A) consumo de glucosa, (B) consumo de galactosa/fructosa, (C) producción de 2,3-BD y (D) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando <i>P. polymyxa</i> y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm.....	34
<b>Figura 4.6.</b> Evolución de (A) consumo de glucosa, (B) consumo de galactosa, fructosa y arabinosa (C) producción de 2,3-BD y (D) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando <i>P. polymyxa</i> y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C. Leyenda: 100 rpm (círculo azul); 200 rpm (cuadrado naranja); 300 rpm (triángulo verde).....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Comparación de experimentos de producción de 2,3-BD con diferentes condiciones de operación, microorganismos, sustratos y biorreactores .....	10
<b>Tabla 2.2.</b> Obtención de 2,3-BD mediante <i>P. polymyxa</i> .....	11
<b>Tabla 2.3.</b> Parámetros de operación para la producción de 2,3-BD mediante <i>P. polymyxa</i> .....	14
<b>Tabla 2.4.</b> Distintos tipos de residuos hortofrutícolas y sus porcentajes según la materia prima .....	20
<b>Tabla 2.5.</b> Productos de valor añadido obtenidos por procesos biotecnológicos partiendo de subproductos hortofrutícolas.....	16
<b>Tabla 4.1.</b> Resumen de resultados de fermentaciones con glucosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.....	29
<b>Tabla 4.2.</b> Resumen de resultados de fermentaciones con fructosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.....	32
<b>Tabla 4.3.</b> Resumen de resultados de fermentaciones con galactosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.....	33
<b>Tabla 4.4.</b> Resumen de resultados de fermentaciones con disoluciones de azúcares, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.....	35
<b>Tabla 4.5.</b> Resumen de resultados de fermentaciones con hidrolizado de zanahoria, variando la velocidad de agitación, 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. 2,3-BD: Características, aplicaciones y síntesis química.

Tradicionalmente, la producción de 2,3-butanodiol (2,3-BD) se ha llevado a cabo partiendo del petróleo como materia prima. Sin embargo, el encarecimiento de este y el aumento de la conciencia global sobre los problemas medioambientales, unidos a los incesantes avances de los procesos biológicos, han favorecido el desarrollo de sistemas de obtención de 2,3-BD por fermentación con microorganismos [1,2].

Este diol, también denominado como 2,3-butilenglicol, consta de 4 átomos de carbono y una estructura ramificada debido a los grupos metilos que lo conforman. Así, existen 3 estereoisómeros, dos de los cuales son entre sí enantiómeros y ópticamente activos, mientras que el restante tiene configuración meso. Dichos isómeros se muestran en la Figura 1.1 [1].

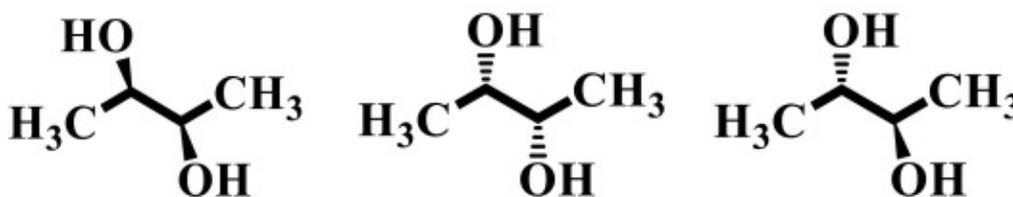


Figura 1.1. De izquierda a derecha: (2S,3S)-2,3-butanodiol; (2R,3R)-2,3-butanodiol; meso-2,3-butanodiol. [1]

El 2,3-BD se caracteriza por tratarse de un compuesto incoloro e inodoro y que, a temperatura ambiente, se presenta en estado líquido, aunque con un cierto aspecto viscoso. Debido a la presencia de grupos hidroxilos en su estructura, el 2,3-BD es polar, soluble en agua, alcoholes y ésteres [3], e higroscópico [4]. Sus propiedades físico-químicas muestran un peso molecular de 90,12 g/mol, con un punto de ebullición de unos 180-182 °C, un punto de fusión de 18-20 °C, una presión de vapor de 23 hPa a 20 °C y una densidad de 1,002 g/cm<sup>3</sup> [5]. Además, su bajo punto de fusión, de -60 °C, lo convierte en un buen anticongelante [6].

Este compuesto químico es usado en un amplio abanico de industrias entre las que se encuentran la química, la alimentaria, la farmacéutica, la cosmética o la agrícola (debido a su capacidad antibacteriana) tanto en forma de materia prima (aditivo) o como intermedio para sustancias de alto valor.

El 2,3-BD puede ser una buena alternativa al bioetanol como biocombustible por ser más económico y seguro a la hora de transportarlo y almacenarlo. Además, al unirse con la metiletilcetona genera octanos por hidrogenación [2].

En lo referente a su función como intermedio de reacción cabe destacar la producción, por deshidratación, del monómero del polibutadieno, un caucho sintético muy importante tanto en el ámbito aeroespacial como en la fabricación de neumáticos y plásticos de alta resistencia [1]. Otros ejemplos son la formación de metiletilcetona

(solvente para tintas o combustibles) por deshidratación, la acetoína y el diacetilo (saborizantes) por deshidrogenación o los precursores de poliamidas por deshidratación y esterificación del 2,3-BD [2].

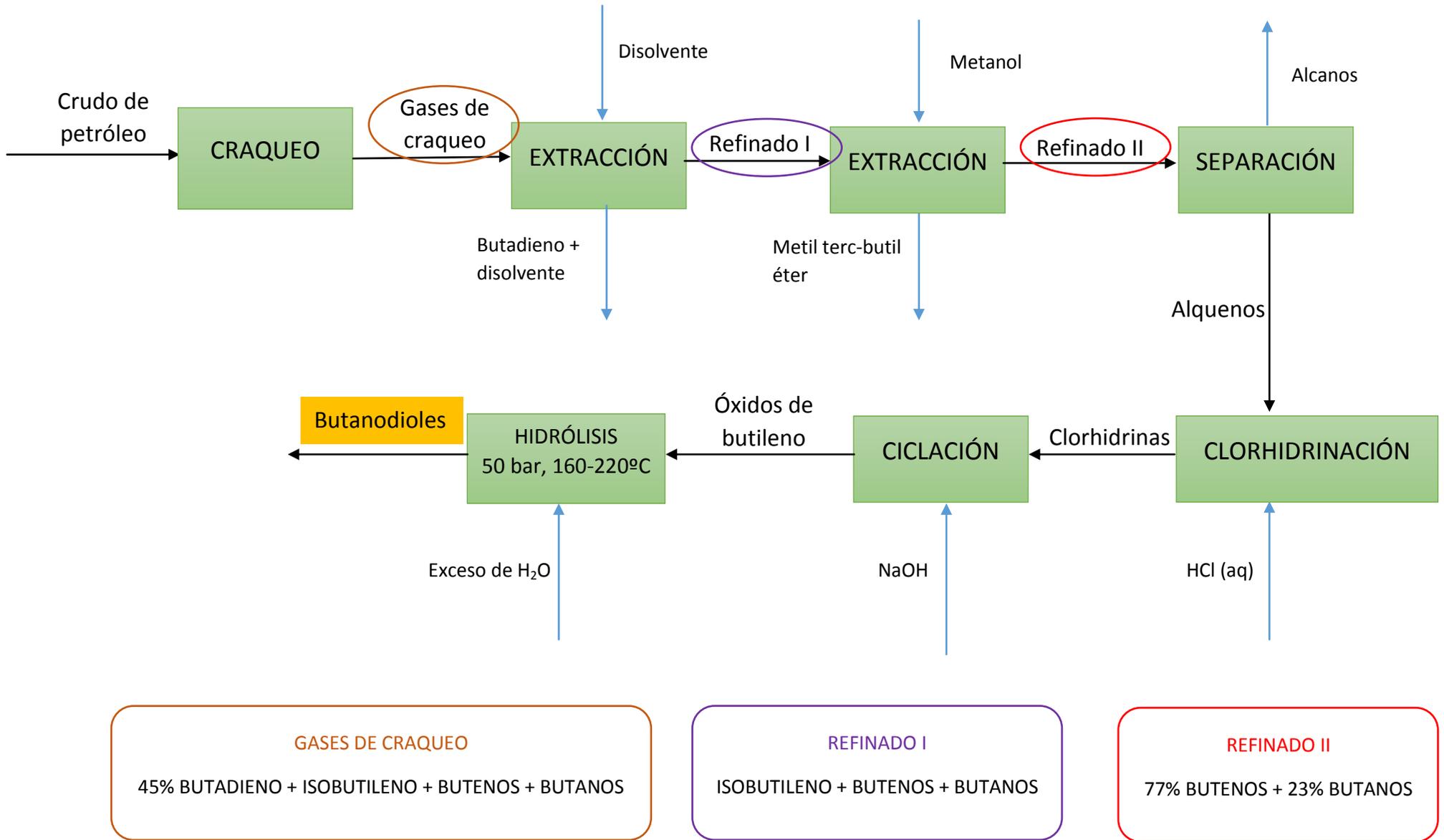
En el 2018, la producción mundial de este compuesto fue de unos 74000 t, con un valor aproximado de 1600 US\$/t [7 - 8]. A pesar de estas elevadas cifras, se espera un importante crecimiento y que en 2030 su valor de mercado sea próximo a los 300 millones de dólares [9]. En 2019, la producción mundial de derivados del 2,3-BD fue de 49 millones de toneladas, con un valor de unos 68.000 US\$ [10].

Tradicionalmente, la producción industrial del butanodiol ha seguido un proceso químico de craqueo del crudo de petróleo para conseguir hidrocarburos de cuatros átomos de carbono que se hidrolizan a altas presiones y temperaturas [11]. Ahondando más en este proceso, y como se muestra en la Figura 1.2, se hace un craqueo en el que se produce butadieno (40-45% en masa) que se separa del refinado inicial mediante extracción con un disolvente. A continuación, se añade metanol para que reaccione con el isobutileno presente, extrayéndolo en forma de metil terc-butil éter, y quedando un segundo refinado con un 77% de buteno-1 y buteno-2 y un 23% de butanos que se separan [12].

Los alquenos se transforman en clorhidrinas mediante una disolución acuosa de HCl. En presencia de hidróxido sódico, los compuestos clorados se ciclan, dando lugar a una mezcla de óxidos de butileno que se hidrolizan con exceso de agua a 50 bar y 160-220 °C, obteniendo, finalmente, una mezcla racémica de butanodiolos [11].

Este proceso presenta varias desventajas al tratarse de una operación con altos costes económicos y energéticos: se requieren elevadas temperaturas y presiones, así como una materia prima que durante los últimos tiempos ha alcanzado precios récord (unos 120\$ cada barril de petróleo [13]). Además, esta vía productiva acarrea dificultades prácticas al trabajarse con pH ácidos y básicos marcados (se emplea ácido clorhídrico y sosa caustica, respectivamente) y supone un notable impacto ambiental ya que las severas condiciones de operación se consiguen mediante el uso de combustibles fósiles [1].

Figura 1.2. Diagrama de bloques de la producción industrial del 2,3-BD siguiendo un proceso químico de craqueo del crudo de petróleo [11]



## 1.2. *Bioprocesos para la producción de 2,3-Butanodiol: estado del arte.*

Como se ha descrito previamente, el proceso clásico de obtención de 2,3-BD basado en la ruta petroquímica presenta varios inconvenientes a nivel económico y ambiental, por lo que el empleo de diferentes tipos de microorganismos para la fermentación de residuos hortofrutícolas se ha convertido en un novedoso y atractivo proceso mediante el que se puede producir dicho compuesto de manera más sostenible, pues la materia prima es más económica y las condiciones de operación mucho menos intensas.

Al tratarse de un bioproceso que se encuentra en desarrollo, existen múltiples factores a tener en cuenta, como son el tipo de materia prima a fermentar, los microorganismos utilizados, la composición de los medios de fermentación o la configuración de los reactores. Así, en los siguientes apartados se muestran las alternativas propuestas en distintos estudios y los resultados obtenidos.

### 1.2.1. RUTA METABÓLICA DE LA BIOSÍNTESIS

En la actualidad se conocen una gran variedad de microorganismos que poseen la capacidad de producir de forma natural 2,3-BD, yendo dicha síntesis acompañada de la generación de ácidos orgánicos. Si bien no hay un completo entendimiento del sentido fisiológico que tiene la producción de 2,3-BD en el interior de las bacterias, la principal y más aceptada hipótesis afirma que el propósito de la generación de este compuesto es evitar una acidificación intracelular pues la síntesis del 2,3-BD siempre comienza con un descenso del pH. Además, otros estudios apoyan esta teoría ya que han comprobado que la presencia de acetato favorece la expresión de los genes involucrados en la producción del 2,3-BD [14].

Esta no es la única función que se le atribuye al 2,3-BD dentro del metabolismo de sus microorganismos productores, sino que también interviene en el correcto mantenimiento de la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  mediante la oxidación del NADH procedente de la glicólisis [15]. Además, en algunos casos se sintetiza 2,3-BD como forma de preservar carbono y energía durante el catabolismo de nutrientes [7].

La ruta metabólica que se sigue para producir 2,3-BD se inicia con una fermentación (habitualmente partiendo de glucosa, aunque es posible utilizar otros azúcares de 5 y 6 átomos de carbono como la xilosa o la arabinosa [1]). El piruvato formado, en vez de transformarse en metabolitos mayoritarios como el acetato o el lactato (como ocurre en la fermentación alcohólica o láctica), reacciona con una enzima denominada  $\alpha$ -acetolactato sintetasa para generar  $\alpha$ -acetolactato.

A partir de este metabolito se pueden obtener todo un conjunto de compuestos interrelacionados como son el diacetilo, los dos isómeros de la acetoina (R y S) y los tres isómeros del 2,3-butanodiol (2R,3R; 2S,3S; y meso). En la Figura 1.3 se muestra un esquema de esta ruta metabólica [2]. Los estereoisómeros obtenidos dependen en gran medida del tipo de microorganismo productor (por ejemplo, la especie *Klebsiella*

produce una mezcla de meso-2,3-BD y (2S,3S)-2,3-BD, mientras que *Paenibacillus polymyxa* produce (2R,3R)-2,3-BD puro).

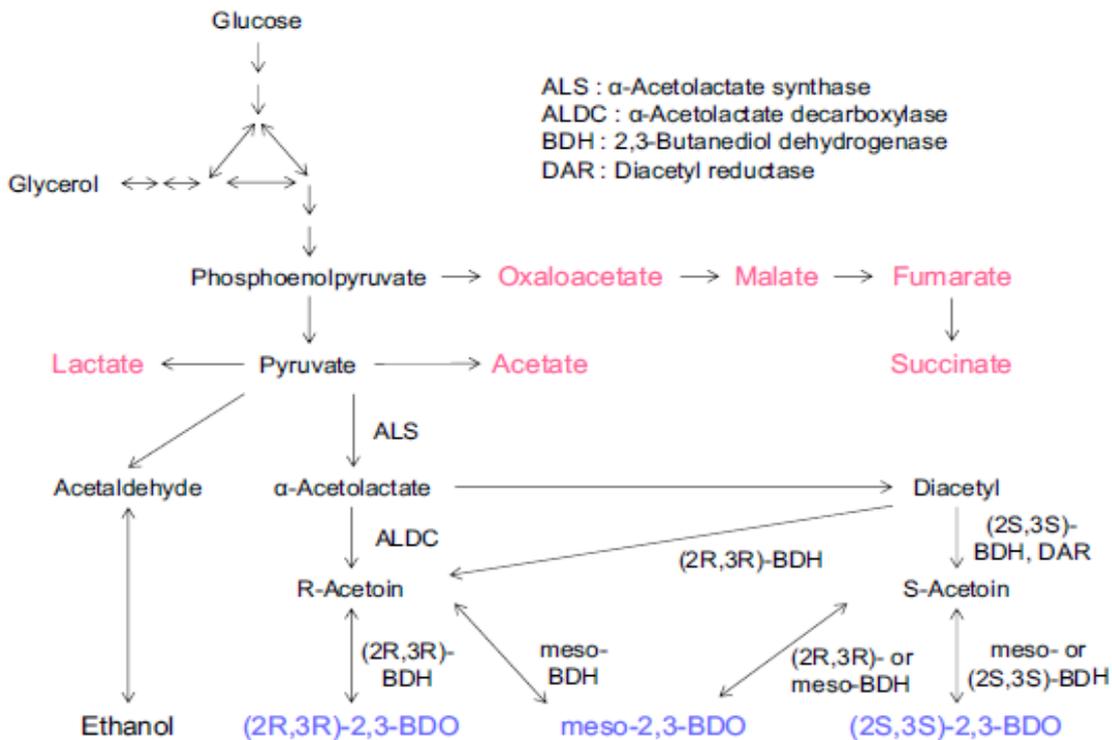


Figura 1.3. Ruta metabólica para la producción de 2,3-BD [2]

### 1.2.2. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE 2,3-BD

Sin duda, la elección del microorganismo va a determinar cuál es la concentración final de 2,3-BD obtenida en la fermentación. En la naturaleza existen gran variedad de organismos productores de este compuesto entre los que se pueden mencionar *Enterobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* o *Ralstonia*. [1]

Se han publicado un gran número de trabajos de investigación en los que emplean distintos tipos de microorganismos para producir 2,3-BD, obteniendo resultados dispares, tanto en concentración como en productividad y rendimiento. En dichos trabajos se utilizan diversos medios de cultivo, materias primas y parámetros de operación por lo que es necesario contextualizar los resultados obtenidos.

Un microorganismo productor es *Klebsiella oxytoca*, con la que se han conseguido concentraciones de 2,3-BD de 131,5 g/L, productividades de 0,84 g/(L·h) y rendimientos de 0,44 g/g. Estos resultados correspondieron a un reactor en régimen semicontinuo y un tiempo de fermentación de 100 horas, con glicerol como sustrato y agitación de 400 rpm [7,24]. El mismo proceso utilizando como materia prima glucosa

e hidrolizado de mazorca de maíz dio lugar a concentraciones de 130 y 35,7 g/L, productividades de 1,63 y 0,59 g/(L·h) y rendimientos de 0,48 y 0,50 g/g, respectivamente. [7]

Otro gran productor de 2,3-BD es *Klebsiella pneumoniae*, produciendo hasta 150 g/L (productividad de 4,21 g/(L·h)) con un cultivo en régimen semicontinuo, glucosa como sustrato, 500 rpm y 37 °C [14]. Reduciendo la agitación a 150 rpm y la temperatura a 35 °C, la concentración de producto disminuye hasta 116 g/L. Empleando otro sustrato como melaza de maíz con las condiciones iniciales también se logra una menor concentración (78,9 g/L) [14]. Todos estos valores se resumen posteriormente en la Tabla 2.1.

Sin embargo, aunque se han demostrado buenos resultados con *Klebsiella*, ni este grupo ni las bacterias *Enterobacter* se utilizan industrialmente debido a que han sido clasificadas como patógenos de “Grupo de Riesgo 2” según la OMS (a excepción de *K. oxytoca*) [15].

Algunos *Bacillus* son también buenos productores como el *B. licheniformis* con el que se ha reportado una concentración de 145 g/L a partir de glucosa en reactor semicontinuo con una velocidad de agitación de 300 rpm y una temperatura de 35 °C (productividad de 1,14 g/(L·h)) [25]. Modificando las condiciones de operación a 50 °C y 500 rpm, la concentración desciende a 123,7 g/L, mientras que la productividad aumenta a 2,95 g/(L·h) (rendimiento de 0,51 g/g) [26].

Mediante *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* es posible obtener 2,3-BD, pero no de forma pura, sino mezclado con acetoína, siendo este último el componente principal de la mezcla. Diversos estudios han demostrado que trabajar con velocidades de agitación más bajas favorece la conversión de acetoína a 2,3-BD. Por ejemplo, *Zhang et al.* [27] trabajaron con velocidades de 350 rpm para maximizar la concentración de 2,3-BD y, posteriormente, la aumentaron hasta 500 rpm para revertir el sentido de la reacción hacia la formación de acetoína [6,27].

Para reducir el coste del producto se están investigando nuevas especies de microorganismos que pueden actuar como productores. Así, *Bacillus* como *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. pumilus* y *B. velezensis* tienen alto potencial por su capacidad para valorizar residuos ricos en glucosa. Si bien el trabajo con estos microorganismos está aún en periodo de desarrollo (no se emplean reactores, sino que se hace fermentación discontinua en matraces) existen ya buenos resultados con concentraciones de 2,3-BD entre 12,0 y 59,1 g/L, productividades entre 1,0 y 1,2 g/(L·h) y rendimientos entre 0,26 y 0,37 g/g. [6,28,29].

Dentro de los *Paenibacillus*, *P. polymyxa* es el microorganismo más comúnmente utilizado para producir 2,3-BD. Es capaz de fermentar tanto glucosa como inulina en régimen discontinuo y semidiscontinuo, obteniéndose un estereoisómero (2R,3R)-2,3-BD casi puro con concentraciones entre 18,80 y 111,00 g/L [21].

El proceso puede ser mejorado aumentando la disponibilidad de oxígeno (de 0,1 a 0,2 vvm), disminuyendo la velocidad de agitación (bajando de 500 a 300 rpm) y añadiendo ácido ascórbico (con concentración de 80 g/L), pasando de 43,66 g/L a 71,71 g/L con un reactor semidiscontinuo y un tiempo de fermentación de 54 h [30].

Los mejores resultados obtenidos con *P. polymyxa* aparecen en el trabajo de investigación de Häßler *et al.* [21] usando la cepa DSM 365 a 37 °C, 200 rpm y con una concentración de extracto de levadura de 10 g/L, alcanzando 69 g/L de 2,3-BD.

Un problema de esta bacteria es la síntesis de exopolisacáridos (EPS) que se producen junto al 2,3-BD, especialmente cuando la concentración del sustrato es elevada o el reactor actúa en régimen discontinuo y que pueden actuar como inhibidores. Se han documentado concentraciones de EPS de 4,97 g/L para *P. polymyxa* [22] y de 12,6 g/L para *B. licheniformis* [28].

Por otro lado, la manipulación genética es una novedad técnica de la que tampoco escapa la producción de 2,3-BD. Así, con los microorganismos manipulados se obtienen enantiómeros de mayor pureza y una productividad y rendimiento superiores.

Un ejemplo es *P. polymyxa* en la que, mediante la eliminación de un gen denominado *dudA*, se consigue (2R, 3R)-2,3-BD con una pureza del 99% [6]. Mediante recombinación genética se utilizan organismos no productores como huéspedes de las enzimas involucradas en la síntesis de BD, siendo uno de ellos *E. coli* con las enzimas ALS y ALDC de *K. pneumoniae* o *S. cerevisiae* con las enzimas de *B. subtilis* [2].

### 1.2.3. MATERIAS PRIMAS Y MEDIO DE FERMENTACIÓN

La selección de materias primas utilizadas en la producción biológica de 2,3-BD es muy importante pues es una de las maneras más directas de abaratar el proceso con respecto al craqueo de petróleo tradicional. Dentro del proceso biológico, las materias primas representan también una parte importante de los costes de producción. Es por ello que es primordial conseguir fuentes renovables y no alimentarias de nitrógeno (orgánico e inorgánico) y de carbono asequibles y disponibles en altas cantidades.

Las fuentes de carbono de bajo precio para la síntesis del compuesto se clasifican como lignocelulósicas y no celulósicas. En este último grupo se pueden incluir las materias o hidrolizados de plantas que contienen sacarosa (caña de azúcar y remolacha), almidón e inulina [6]. Utilizando estos sustratos con *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 y *P. polymyxa* ZI-9 se produjo 2,3-BD con una productividad de 0,58 g/(L·h) y 3,4 g/(L·h), respectivamente [16]. Otros recientes estudios han mostrado el potencial de la sacarosa como materia prima: fermentando jugo de caña de azúcar en régimen semicontinuo con *Bacillus subtilis* consiguieron concentraciones entre 35 y 65 g/L, mientras que con *Bacillus amyloliquefaciens* los valores fueron inferiores, de 25,3 g/L [17].

Durante los últimos años, se han empleado otras materias primas: desde residuos hortofrutícolas hasta sueros de leche o melazas industriales, pasando por glicerina residual. Esta última es una gran oportunidad de mercado ya que la glicerina o glicerol se genera durante la producción de biodiesel (100 g por cada kg de combustible). Pese a que es altamente nocivo para el medioambiente, puede ser muy aprovechable para fermentarlo a 2,3-BD [6].

Se han realizado experimentos utilizando residuo de manzana como sustrato y *B. licheniformis* como productor que demostraron que era necesaria la adición de glucosa o sacarosa para producir 2,3-BD. Con la adición de glucosa se lograron concentraciones de 51-113 g/L, mientras que para el otro caso se alcanzó una concentración de 51,53 g/L con una productividad de 0,43 g/(L·h) [7].

Mezclando melaza de remolacha (15%) con glicerol procedente de biodiesel (85%) y empleando el microorganismo *B. amyloliquefaciens* se consiguieron resultados muy prometedores ya que la melaza como co-sustrato estimuló la producción de 2,3-BD y redujo los tiempos de fermentación. Los resultados fueron una elevada concentración de 102,3 g/L y una productividad de 0,87 g/(L·h) [18].

La biomasa vegetal que contiene celulosa y lignocelulosa es una interesante materia prima ya que es renovable, abundante y sostenible. Los residuos agroindustriales suelen contener ambos tipos de carbohidratos, siendo algunos ejemplos las mazorcas de maíz y otros residuos de cereales como la paja de trigo, la cáscara de cebada y arroz, el bagazo de caña de azúcar o los restos madereros. De media, estos desechos contienen un 30-50% de celulosa, 16-28% de hemicelulosa y 6-12% de lignina.

Se han publicado muchos experimentos con hidrolizados lignocelulósicos como la fermentación en régimen discontinuo de hidrolizado de paja de maíz con *B. licheniformis* (concentración de 74 g/L y productividad de 2,1 g/(L·h) de 2,3-BD [19]) o la fermentación de mazorca de maíz con *P. polymyxa* (rendimiento de 0,3 g/g de azúcar [20]).

En lo referente a las fuentes de nitrógeno estas son muy importantes para mejorar el rendimiento y algunos ejemplos son la adición de extracto de levadura y el uso de sales de amonio, urea o triptona. Häßler et al. [21,22] consiguieron alcanzar una concentración de 111 g/L de 2,3-BD al añadir 10 g/L de extracto de levadura en el medio de fermentación, superando los 72 g/L que se producían cuando la fuente de nitrógeno era menor (5 g/L) trabajando con el microorganismo *P. polymyxa*.

Junto a las fuentes nitrogenadas y de carbono, también se ha demostrado adecuada la suplementación del medio con fosfato y acetato, cationes como  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , vitaminas y oligoelementos [6,22]. Algunos estudios han mostrado que, junto al extracto de levadura, los elementos más cruciales en la producción de 2,3-BD son  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  pues la adición de sales como KCl elevaron la productividad de 1,48 a 2,01 g/(L·h) [28]. En procesos semicontinuos de *P. polymyxa* con glucosa como sustrato a pH constante de 6,8 se ha conseguido mejorar el rendimiento con la adición de acetato

con una relación de 0,35 mol acetato por mol de glucosa, elevando la productividad de 0,261 a 0,467 g/g de azúcar [23].

#### 1.2.4. BIORREACTORES

Uno de los principales problemas que presenta el bioproceso de producción de 2,3-BD es la recuperación del compuesto del propio medio de cultivo. Para favorecer que la separación del producto se busca maximizar la concentración de 2,3-BD en el medio, disminuyendo así la carga o cantidad de agente de separación.

Esta razón es una de las que más peso tiene a la hora de seleccionar un sistema semicontinuo (adición intermitente de sustrato) o discontinuo ya que ambos ofrecen concentraciones de producto relativamente elevadas. Sin embargo, este último tiene ciertas desventajas ya las productividades son menores y las concentraciones de 2,3-BD pueden ser bajas cuando la concentración inicial de sustrato es baja. Un aumento de dicha carga inicial solventaría el problema comentado, pero puede llevar asociado una inhibición por sustrato importante [1].

Otro aspecto a tener en cuenta con estas dos configuraciones del biorreactor es que los microorganismos se encuentran expuestos constantemente al aumento de concentración del 2,3-BD. Por ello es necesario que estos organismos tengan capacidad de tolerancia hacia dicho compuesto [2]

Si bien las opciones más utilizadas son las configuraciones discontinuas y semicontinuas, el cultivo continuo (en el que tanto el sustrato como el producto se alimentan y se retiran de forma continua) es una alternativa que ha sido ampliamente analizada por su mayor productividad [2].

Con esta configuración el fermentador puede funcionar prácticamente en estado estacionario a máxima velocidad de reacción y, por ello, conseguir una producción superior al biorreactor discontinuo. Sin embargo, el mayor inconveniente del biorreactor continuo es la dificultad para aumentar la concentración final de 2,3-BD por la imposibilidad de incrementar la concentración del sustrato [1].

En conclusión, los biorreactores en régimen discontinuo y semicontinuo permiten alcanzar mayores concentraciones finales (consecuentemente menor coste energético para su posterior separación), mientras que los biorreactores continuos favorecen la obtención de altos valores de producción y productividad.

En la Tabla 2.1 se resumen resultados obtenidos con diferentes biorreactores, indicando el microorganismo productor, la concentración, la productividad, el rendimiento y las condiciones de operación.

En la Tabla 2.2. se reflejan los resultados obtenidos a partir de la bibliografía en la que se utilizan diferentes cepas de *P. polymyxa*, que es el microorganismo que va a emplear en la parte práctica de este trabajo.

Tabla 2.1. Comparación de experimentos de producción de 2,3-BD con diferentes condiciones de operación, microorganismos, sustratos y biorreactores

Microorganismo	Sustrato	2,3-BD (g/L)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/(L·h))	Biorreactor	Temperatura/ pH/Agitación	Referencia
<i>K. pneumoniae</i> NRRL B199	Glucosa	35	0,50	4,83	Continuo	30°C/5,5/150rpm	[30]
<i>K. pneumoniae</i> SDM	Glucosa	116	0,49	2,21	Semicontinuo	35°C/6,5/150rpm	[30]
<i>E. aerogenes</i> DSM	Glucosa	43	0,78	5,6	Continuo	30°C/5,5/400rpm	[22]
<i>K. oxytoca</i> KMS005	Glucosa	117	0,49	1,2	Semicontinuo	37°C/6,0/300rpm	[21]
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa	2	-	0,02	Discontinuo	37°C/5,5/0rpm	[2]
<i>B. licheniformis</i>	Hidrolizado de celulosa	145	0,40	1,14	Semicontinuo	30°C/6,6/100rpm	[31]
<i>B. subtilis</i>	Glucosa	50	0,47	0,1	Discontinuo	37°C/5,5/100rpm	[32]
<i>B. subtilis</i>	Glucosa	104	0,46	0,46	Semicontinuo	37°C/6,5/300rpm	[32]
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Glucosa	133	-	2,95	Semicontinuo	37°C/6,5/350rpm	[33]
<i>S. cerevisiae</i> JHY613	Xilosa	73	0,41	1,43	Semicontinuo	30°C/6,0/170rpm	[2]
<i>P. polymyxa</i> DSM365	Glucosa	69	0,34	0,70	Semicontinuo	35°C/6,0/300rpm	[22]
<i>P. polymyxa</i> DSM365	Glucosa	51	0,42	1,70	Discontinuo	35°C/6,0/300rpm	[22]

Tabla 2.2. Obtención de 2,3-BD mediante *P. polymyxa*

Cepa	Sustrato	2,3-BD (g/L)	Rendimiento (g/g)	Productividad (g/(L·h))	Biorreactor	Referencia
ZJ-9	Extracto de inulina	37,6	0,51	0,89	Discontinuo	[34]
ZJ-9	Inulina	51,3	-	-	Semicontinuo	[27]
ZJ-9	Extracto de inulina	37,6	-	-	Discontinuo	[27]
CJX 518	Glucosa	71,7	-	1,33	Semicontinuo	[30]
DSM 365	Glucosa	68,5	0,34	0,70	Semicontinuo	[22]
DSM 365	Sacarosa	111,0	-	2,06	Discontinuo	[21]
DSM365	Glucosa	51,1	0,42	1,70	Discontinuo	[22]
ICGEB20008	Hidrolizado de celulosa	16,5	0,33	2,01	Discontinuo	[31]
ATCC 12321	Glucosa + xilosa	18,80	0,31	1,13	Continuo	[6]

### 1.2.5. PARÁMETROS DE PROCESO

Los parámetros de operación que más influyen en el proceso son la temperatura, el pH del medio de cultivo, la tasa de aireación y la velocidad de agitación, siendo estas dos últimas claves para optimizar la formación de 2,3-BD y evitar la reacción reversa hacia la acetoína.

En este apartado se comentan las condiciones operativas para conseguir butanodiol por fermentación con *P. polymyxa* al ser dicho microorganismo el que será utilizado en este TFM.

**A) Temperatura:** En diferentes trabajos se ha determinado que el intervalo óptimo de operación está comprendido entre 32-37 °C. *Okonkwo et al.* [22] usando la cepa DSM 365 ha optimizado la fermentación trabajando a 35°C, obteniendo concentraciones de 51,1 g/L trabajando en régimen discontinuo y de 68,5 g/L operando en régimen semicontinuo. Por su parte, *Dai et al.* [30] ha empleado la cepa CJX518 y los mejores resultados se obtuvieron a 37°C (71,7 g/L de 2,3-BD en régimen semicontinuo).

**B) pH:** Este parámetro no es de control obligatorio ya que la formación de ácidos orgánicos no suele ser muy elevada, por lo que lo más importante suele ser el establecimiento de un pH inicial cercano a 6,5 [6]. También se puede operar con biorreactores en los que haya un control de pH, variando el valor entre 5,5 y 7 según la cepa.

El aumento del pH por encima de 7 puede suponer la aparición de compuestos orgánicos los cuales disminuyen el rendimiento de la fermentación. Si la acidez del medio se incrementa y el pH cae por debajo de 5 la conversión del sustrato disminuye, resultando en una menor productividad [35].

**C) Aireación:** Como se ha mencionado previamente, este parámetro sirve para regular el ratio acetoína/2,3-BD del proceso puesto que, como se ha comentado previamente, el 2,3-BD interviene en el equilibrio NADH/NAD<sup>+</sup>. Las reacciones redox que transforman el NADH en NAD<sup>+</sup> y viceversa utilizan oxígeno por lo que la mayor o menor presencia de este en el medio favorecerá o dificultará la síntesis del 2,3-BD. [6].

Para favorecer la reducción de la acetoína al 2,3-BD es necesaria la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. Así, cuando las condiciones son de exceso de oxígeno, la fosforilación oxidativa convierte casi todo el NADH en NAD<sup>+</sup>, quedando un número muy bajo de moléculas de NADH sin oxidar. El resultado es una formación de 2,3-BD muy baja [36].

Es por ello que se ha comprobado que para valores de oxígeno disuelto menores a 0,2 ppm predomina el 2,3-BD, siendo necesario ajustar la velocidad de agitación y el flujo de aire [37]. Para *P. polymyxa* CS107 se han determinado que con valores de 0,2 vvm y 400 rpm se maximiza la concentración final (59,5 g/L) [38]. Una posible

alternativa que puede servir para regular de manera adecuada el oxígeno en el medio es un sistema con varias etapas de aireación.

En la Tabla 2.3 se muestran las condiciones de operación con las que se ha optimizado la concentración de 2,3-BD en diferentes experimentos, usando varias cepas de *P. polymyxa*.

Tabla 2.3. Parámetros de operación para la producción de 2,3-BD mediante *P. polymyxa*

Cepa	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Aireación (vvm)	Concentración 2,3-BD (g/L)	Referencia
DSM 365	35	6,5	300	0,075	68,50	[22]
DSM 365	37	6,0	500	0,2	111,00	[21]
ATCC 12321	37	6,5	500	0,2	18,80	[35]
CJX 518	37	5,2	400	0,1	19,11	[30]
CJX 518	37	6,0	300	0,2	19,06	[30]
ZJ-9	30	6,0	240-120*	-	36,92	[34]

\*Durante las primeras horas la agitación fue de 240 rpm para facilitar el crecimiento celular y después se disminuyó a 120 rpm para favorecer una mayor formación de 2,3-BD

### 1.3. *Residuos hortofrutícolas para la obtención de bioproductos.*

Hace años, los residuos hortofrutícolas solían ser utilizados por agricultores y ganaderos como abono para sus cultivos. Sin embargo, el aumento en el volumen de dichos residuos debido al perfeccionamiento de las tareas agrícolas (y consecuentemente a la mayor producción de alimentos) ha hecho que sean necesarios tratamientos más específicos y rentables.

Los desechos hortofrutícolas son ricos en material orgánico, sobre todo lignocelulósico, proteico y carbohidratos. Esto hace que en los últimos años se hayan desarrollado tratamiento de valorización de estos residuos con el objetivo de aprovecharlos mediante la aplicación de bioprocesos, transformándolos en energía, biocombustibles, abonos y fertilizantes u otros compuestos químicos de elevado interés comercial, como es el caso del 2,3-BD.

Un ejemplo de la aplicación industrial de estos desechos es la obtención de energía mediante la combustión de la biomasa o de los subproductos obtenidos de ella. Así, según la Agencia Internacional de Energía, hasta un 50% de toda la demanda energética que va a existir en el planeta durante el S. XXI podría ser satisfecha mediante la biomasa [39].

En cuanto al auge de los biocombustibles como pueden ser el biodiesel, obtenido del aceite de semillas oleaginosas, o el bioetanol, por fermentación de azúcares de distintos vegetales, cabe señalar que ha llevado consigo un incremento del precio de diversos productos de alimentación. Es por ello que los residuos lignocelulósicos (bagazos, hierbas, serrín...) son una ventajosa alternativa para su producción al ser económicos, de alta disponibilidad y sencillo procesamiento. [40].

Sin embargo, aunque esta tecnología tiene muchos aspectos positivos como son la reducción de emisiones, beneficios económicos y laborales y el desarrollo de la economía circular, también puede presentar ciertos inconvenientes como la emisión de compuestos contaminantes (un ejemplo son los aldehídos producidos durante la combustión del bioetanol).

Inciendo en valores numéricos, las actividades agrofrutícolas produjeron más de 124 millones de toneladas de frutas, hortalizas y verduras en Europa en 2016, de las cuales cerca de un 25% fueron de origen español, siendo este país el principal productor y exportador continental [41]. Sin embargo, desde el origen, es decir desde la recogida del producto, hasta el final de la cadena de consumo, una media de un 45% de la producción, como se muestra en la Tabla 2.4, se desaprovecha y es aquí donde se presenta la oportunidad de usar estos subproductos de manera sostenible [42]. Por otro lado, según el Departamento de Energía de EEUU, en el país norteamericano se producen unos 500 millones de toneladas al año de residuos alimentarios de los cuales al menos un 40% son hortofrutícolas, llegando a venderse a un precio de 20-50 US\$/t [43].

Tabla 2.4. Distintos tipos de residuos hortofrutícolas y sus porcentajes de desperdicio según la materia prima [42]

<b>Materia prima</b>	<b>Tipo de residuos</b>	<b>%residuos</b>
Tomate	Piel, pepita, podridos	15
Pimiento	Corazones, pieles	50-60
Alcachofa	Brácteas, tallos	60-65
Judía verde	Puntas	28
Puerro	Hojas, raíces	47
Cardo	Penca, hoja, corazón	65
Acelga	Penca, hojas	48
Melocotón	Pieles, hueso	22-28
Pera	Pieles, corazón	42-45

A continuación, en la Tabla 2.5 se muestran ejemplos de la obtención de productos de valor añadido mediante bioprocesos a partir de subproductos hortofrutícolas [41].

Tabla 2.5. Productos de valor añadido obtenidos por procesos biotecnológicos partiendo de subproductos hortofrutícolas [41]

<b>Producto de valor añadido</b>	<b>Subproducto hortofrutícola</b>	<b>Microorganismo usado</b>
<b>Enzimas</b>		
Enzimas amilolíticas	Mango	<i>Fusarium solani</i>
	Plátano	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Enzimas lignocelulolíticas	Palma	<i>Rhizopus stolonifer</i>
	Plátano	<i>Pseudomonas putida</i>
Enzimas pectinolíticas	Cáscara de piña	<i>Aspergillus niger</i>
	Piel de naranja	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Proteasa	Cáscara de algarrobo	<i>Aspergillus sp.</i>
	Cáscara de granada	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Ácidos orgánicos</b>		
Ácido láctico	Cáscara de patata	<i>Lactobacillus casei</i>
	Maíz dulce, mango	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<b>Biocombustible</b>		
Etanol	Extracto de dátil	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Biopolímeros</b>		
Goma xantana	Zumo de dátil	<i>Xanthomonas campestris</i>
Curdano	Zumo de dátil	<i>Rhizobium radiobacter</i>
<b>Colorante</b>		
Carotenos	Extracto de dátil	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Biomasa</b>		
Levadura de panadería	Azúcar de dátil	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Probiótico	Polvo de dátil	<i>Lactobacillus casei</i>

### 1.3.1. VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DE ZANAHORIA

En relación con el apartado anterior, según la FAO, aproximadamente un tercio de la producción mundial de alimentos se pierde o desperdicia. La pérdida de alimentos hace referencia a la disminución de la masa de alimentos comestibles que se pierde, desecha o degrada durante las etapas de la cadena de suministro de alimentos, mientras que el desperdicio se refiere a los alimentos retirados intencionalmente de la misma cadena debido a que no cumple con los estándares [44].

Como se ha comentado previamente, los hortofrutícolas son los alimentos que mayor cantidad de residuos produce (45%). En particular, la zanahoria, que es el residuo que va a utilizarse en la parte experimental de este TFM, es el alimento más retirado antes de entrar en la línea de procesamiento de productos (por no cumplir los estándares de calidad), representando el 26% del flujo total (prácticamente un 14% de la masa de la materia prima) [45].

Las zanahorias se encuentran entre las diez hortalizas más producidas en el mundo, con más de 37 millones de toneladas al año. Tras pasar por la línea de procesamiento, los residuos de zanahoria constituyen casi el 50% de la materia prima, que sumado al 14% que se retira antes de entrar al procesamiento convierten a esta hortaliza en una gran fuente de residuos [46].

Habitualmente, las empresas pertenecientes a la industria del procesamiento de frutas y hortalizas no tienen el espacio o el equipamiento necesario para manejar los residuos sólidos de zanahorias. Aproximadamente en 15-20% de las zanahorias retiradas son consumidas por animales en forma de pienso, pero el resto no tienen ninguna función y ocasionan un grave problema económico y, sobre todo, ambiental ya que presentan una alta humedad y provocan malos olores y proliferación de insectos durante su descomposición. La valorización de todos estos residuos es la mejor alternativa económica y ambiental [47].

Existen muchos trabajos de investigación que demuestran la elevada concentración de compuestos antioxidantes (vitaminas A, B, C, D, E, K, carotenoides, minerales...) en los desechos de zanahoria. Gracias a los beneficios para la salud asociados a estos compuestos, la valorización de residuos de zanahoria suele estar orientada a la valorización de compuestos bioactivos [48]. Sin embargo, recientemente se está tratando de aprovechar el residuo al completo, en el marco de biorrefinería, separando el jugo y la pulpa y aplicando a cada componente un tratamiento de valorización diferente [49].

## 2. OBJETIVOS

El objetivo global de este TFM es estudiar la obtención de 2,3-BD mediante fermentación en régimen discontinuo con el microorganismo *P. polymyxa* utilizando distintos sustratos: disoluciones modelo de un único monosacárido, disoluciones modelo de mezclas de monosacáridos e hidrolizado de zanahoria.

Con este fin, los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

1º) Llevar a cabo una revisión bibliográfica para seleccionar un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo, probando con medios de diferente composición.

2º) Analizar la preferencia en el consumo de monosacáridos de *P. polymyxa*, determinando qué azúcar consume más rápido y cómo afecta la presencia de diferentes tipos de azúcares a su asimilación.

3º) Obtener 2,3-BD a partir de destrío de zanahoria y analizar cómo influye la velocidad de agitación en el consumo de azúcares y concentración de 2,3-BD.

El trabajo de investigación se enmarca en el proyecto de investigación: Estrategias para la valorización efectiva de residuos hortofrutícolas: producción de compuestos bioactivos y biocombustibles avanzados financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Referencia: PID2020-115110RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) y se ha llevado a cabo en el Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. *Microorganismo y condiciones de cultivo*

El microorganismo utilizado en este estudio ha sido la cepa DSM 365 de *Paenibacillus polymyxa* (DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Culture, Germany). El procedimiento para la activación del microorganismo, su mantenimiento y el crecimiento del inóculo se explica a continuación:

##### 3.1.1. ACTIVACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Para la activación del microorganismo se ha seguido el protocolo DSMZ de reactivación de microorganismos desde ampollas. Para ello se ha preparado un medio de crecimiento en placas de agar con la siguiente composición: 1 mL del microorganismo *P. polymyxa*, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de carne y 15 g/L de agar. Tras esto se ha ajustado el pH a 7 y se han añadido 10 mg/L de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  para favorecer la esporulación. Por último, se ha hecho un crecimiento “overnight” a 30 °C durante 12 h.

El mantenimiento o almacenamiento del microorganismo reactivado se ha realizado mediante stocks de glicerol al 40% en crioviales de 2 mL (0,9 mL de microorganismo y 0,9 mL de glicerol al 80%) que se han conservado a -80 °C en un congelador, como se observa en la Figura 3.1.

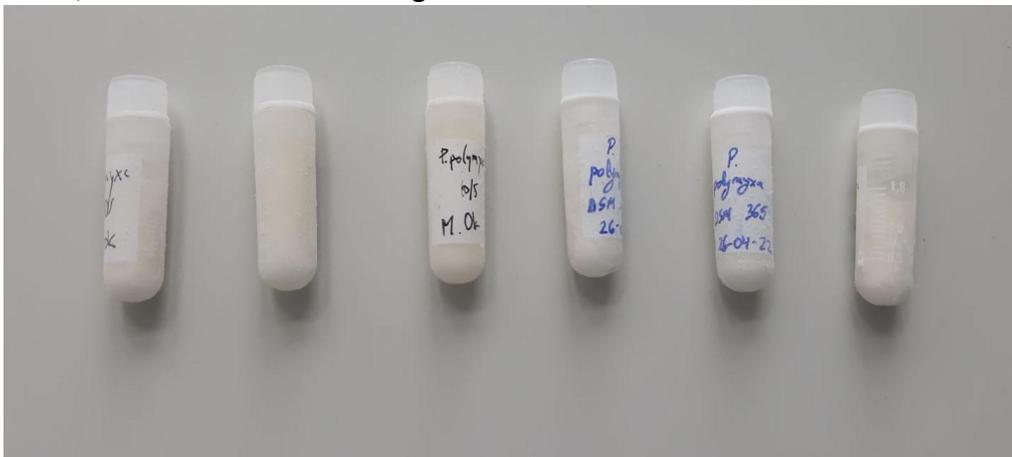


Figura 3.1. Crioviales con stock de microorganismo con glicerol al 40%

##### 3.1.2. CRECIMIENTO DEL INÓCULO

Tanto para el crecimiento del inóculo como para la fermentación se han empleado dos medios distintos para comprobar cuál ofrece mejores resultados: medio de crecimiento Häbler [21] y medio de crecimiento Okonkwo [22].

#### A) MEDIO HÄBLER

Para el medio de crecimiento Häbler se han preparado un total 100 mL en un matraz aforado de 250 mL en dos etapas consecutivas. Primero se han preparado 90 mL con la siguiente composición: 20 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 0,2

g/L  $\text{MgSO}_4$ , 3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A continuación, y con material esterilizado, se han añadido 10 mL del buffer fosfato (potásico/sódico, pH 6), 0,3 mL de elementos traza y 0,9 mL del stock del microorganismo con glicerol al 40%, resultando en un volumen total próximo a los 100 mL.

La disolución de elementos traza (se ha preparado 1 L de disolución) contiene: 0,4 g/L de  $\text{FeSO}_4$ , 5 g/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g/L de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,08 g/L de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  y 0,01 g/L de biotina. Dicha disolución se ha preparado disolviendo el  $\text{FeSO}_4$  en 3 mL de HCl al 25%, añadiendo 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura y, posteriormente, añadiendo el resto de sales en el orden mencionado anteriormente. Tanto el buffer como los elementos traza disoluciones han sido esterilizadas por filtración usando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Una vez preparado, se deja crecer el inóculo durante 24 h en un agitador orbital (Comecta Optic Ivymen, España) a 37 °C y 200 rpm. [21]

## B) MEDIO OKONKWO

Para este medio de crecimiento primero se ha preparado antes un “medio de pre-crecimiento” en un matraz aforado de 100 mL. Este medio de pre-crecimiento (volumen total de 30 mL) contiene: 20 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de triptona, 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4$  y 3 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A esta disolución se le añade con material esterilizado 0,9 mL del stock del microorganismo, 0,9 mL de buffer fosfato (pH 6,5) y 0,09 mL de la disolución de elementos traza. Este medio se ha dejado crecer durante unas 10-12 h en un agitador orbital a 37 °C y 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de 1,0-1,2.

El buffer fosfato contiene: 3,5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 2,75 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . La disolución de elementos traza (se ha preparado 1 L de disolución) contiene: 0,4 g/L de  $\text{FeSO}_4$ , 5 g/L de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,04 g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g/L de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,08 g/L de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  y 0,01 g/L de biotina. Dicha disolución se ha preparado disolviendo el  $\text{FeSO}_4$  en 3 mL de HCl al 25%, añadiendo 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura y, posteriormente, añadiendo el resto de sales en el orden mencionado anteriormente. Ambas disoluciones han sido esterilizadas por filtración usando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Una vez se ha alcanzado la densidad óptica adecuada, 10 mL de la disolución con el microorganismo en crecimiento se han transferido a otro matraz aforado de 250 mL que, previamente, contenía 90 mL de medio de pre-crecimiento esteril sin microorganismo (es decir que contenía los nutrientes, 3 mL de buffer y 0,3 mL de elementos traza). El medio de crecimiento final, con un volumen de 100 mL, se incubó otras 2-3 h con las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta que vuelva a alcanzar una densidad óptica de 1,0-1,2 [22].

### 3.2. Fermentaciones en régimen discontinuo

Las fermentaciones han sido llevadas a cabo en matraces aforados de 250 mL. Los medios de fermentación basados en el método de Häßler se han preparado de la siguiente manera: primero se han preparado 80 mL de disolución añadiendo el sustrato seleccionado en cada caso y los nutrientes (extracto de levadura 10 g/L,  $MgSO_4$  0,2 g/L y  $(NH_4)_2SO_4$  3 g/L); a continuación, se ha esterilizado la mezcla utilizando un autoclave (JP Selecta Med-12, España) a 121 °C-15 min, con la excepción de las disoluciones con fructosa que se esterilizan por filtración para evitar la degradación del monosacárido. Por último, y con material esterilizado, se añaden 10 mL del buffer fosfato potásico/sódico, 0,3 mL de elementos traza y 10 mL del inóculo ya crecido con el medio de crecimiento correspondiente.

Para las fermentaciones con medio Okonkwo el procedimiento ha sido idéntico, modificando el volumen de disolución inicial preparada, 87 mL en este caso, y los nutrientes añadidos (extracto de levadura 5 g/L, triptona 5 g/L,  $MgSO_4$  0,2 g/L y  $(NH_4)_2SO_4$  3 g/L). Cuando el medio ya está esterilizado se añaden 3 mL de buffer fosfato, 0,3 mL de elementos traza y 10 mL de inóculo crecido en el medio Okonkwo.

En ambos casos, una vez los medios de fermentación están preparados, se cubre la boca del matraz con algodón y se llevan a un agitador orbital a 37 °C y 200 rpm. En algunos ensayos, se modificó la velocidad de agitación para estudiar la influencia de dicho factor en la producción de 2,3-BD.

Como sustrato han sido utilizados tanto disoluciones modelo de azúcares (puros o mezclas) como un hidrolizado de zanahoria. Los medios modelo empleados han sido:

- Glucosa con concentraciones de 30,50,70,90,110 y 130 g/L (tanto en medio Häßler como en medio Okonkwo)
- Fructosa con concentraciones de 30,50,70,90,110 y 130 g/L (solo en medio Häßler)
- Galactosa con concentraciones de 30,50,70 y 90 g/L (solo en medio Häßler)
- Mezclas de glucosa/galactosa (40/20 g/L) y glucosa/fructosa (40/20 g/L) (solo en medio Häßler)

El hidrolizado enzimático de zanahoria ha sido preparado siguiendo el procedimiento explicado el trabajo de orientación investigadora a este TFM [50]. La hidrólisis se ha realizado con una carga del 10% (p/v) y con una mezcla de enzimas, Viscozyme+Cellic CTec2, ambas con una concentración de 10 FPU/g materia seca. Antes de la fermentación, la disolución hidrolizada se mezcla, separando la fase sólida de la líquida que es que va a ser fermentada.

La toma de muestras se ha realizado cada 24 h, empezando en el momento inicial o tiempo 0 y se ha prolongado hasta que los resultados indicaban que el consumo de azúcares había finalizado. Se han tomado 2 mL en cada muestra en viales Eppendorf y se han congelado para su posterior análisis. En dichos análisis se ha

determinado la concentración de azúcares, de biomasa y de productos (2,3-BD, etanol y acetoína).

### 3.3. Métodos analíticos

Las concentraciones de los diferentes componentes (monosacáridos, 2,3-BD, acetoína y subproductos como el etanol) han sido determinadas utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) mediante una columna Aminex HPX-87H. El detector usado ha sido el detector de índice de refracción Waters 2414 para los carbohidratos.

La temperatura de la columna ha sido de 60 °C para una correcta identificación del 2,3-BD y de la acetoína. Como fase móvil se ha empleado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01M con un flujo de 0,6 mL/min. Antes de analizarlas, las muestras han sido centrifugadas a 13.400 rpm durante 10 min, diluidas en agua (dilución 1:4) y filtradas con filtros de nylon Millipore de 0,2 µm.

La determinación del crecimiento celular del microorganismo durante la etapa del crecimiento del inóculo se ha determinado a partir de la densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) mediante espectrofotometría (UVmini-1240, Shimadzu, Japón). Sin embargo, el crecimiento celular del microorganismo durante la fermentación ha sido determinado por filtración de las muestras con filtros de 0,22 µm y diferencia de pesaje de los filtros según la Ecuación 3.1.

$$\text{Concentración celular (g/L)} = \frac{m_{\text{filtro +células}} - m_{\text{filtro inicial}}}{V_{\text{muestra}}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Selección del medio de crecimiento.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos durante los experimentos de fermentación con un azúcar modelo como es la glucosa empleando ambos medios de crecimiento, el Häßler y el Okonkwo. El objetivo es determinar con qué medio de crecimiento se consiguen los mejores resultados en cuanto a producción de 2,3-BD para proseguir el resto de experimentos solo con uno de los dos.

Como sustrato se ha elegido glucosa porque es el monosacárido presente en la zanahoria en mayor concentración. Para determinar la capacidad de asimilación de glucosa por parte del microorganismo, se han llevado a cabo fermentaciones con las siguientes concentraciones: 30-50-70-90-110-130 g/L.

Todos los experimentos se han realizado siguiendo el mismo procedimiento tal y como se explica en el epígrafe 3. MATERIALES Y MÉTODOS. Las condiciones de operación han sido 37 °C y 200 rpm, siguiendo la información bibliográfica, y el parámetro a estudiar ha sido la concentración de 2,3-BD en cada uno de los medios utilizados. En la Figura 4.1 se muestra la evolución en el consumo de glucosa y en la producción de 2,3-BD y acetoína.

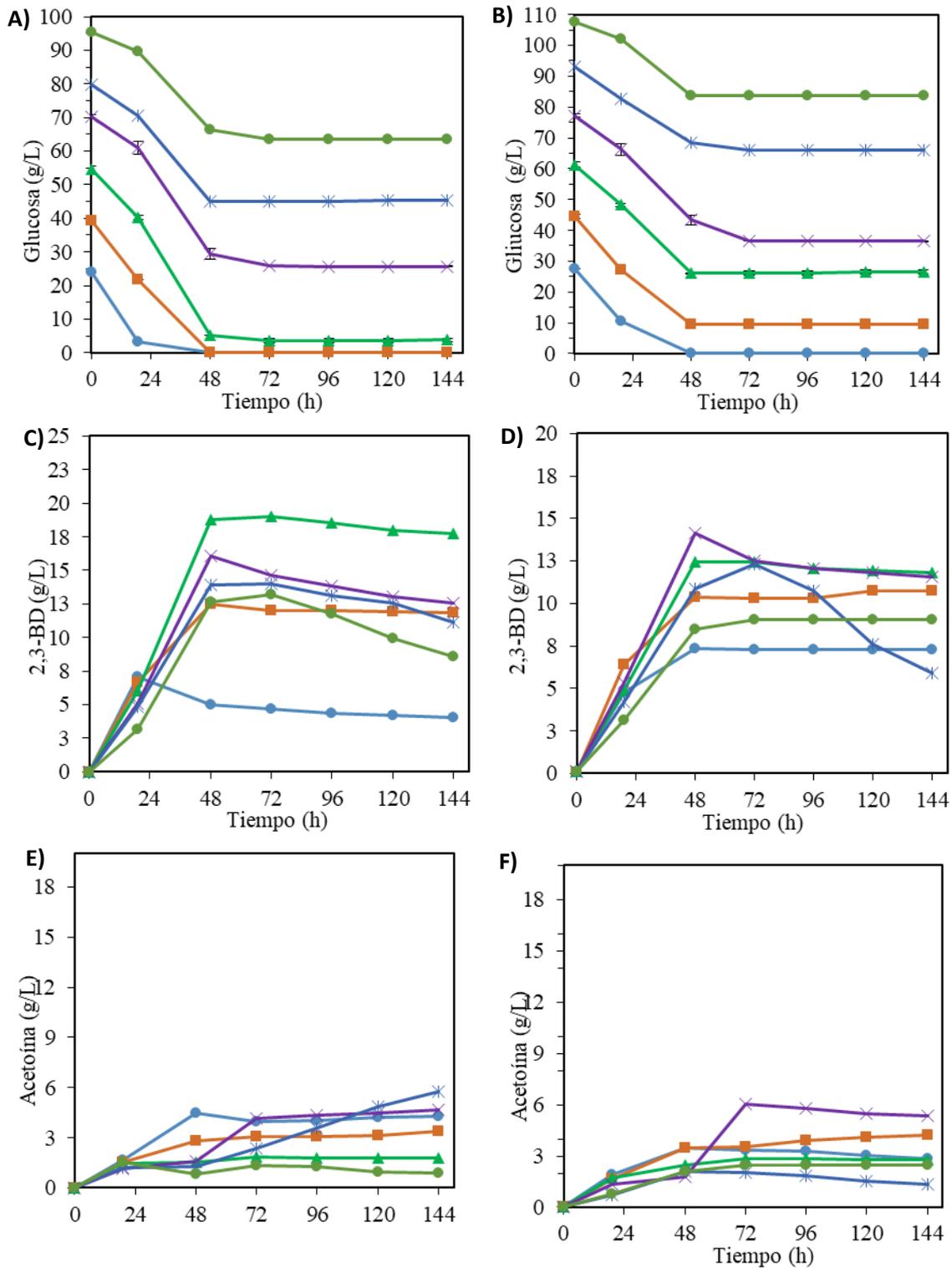


Figura 4.1. Evolución de (A) consumo de glucosa en medio Häßler, (B) consumo de glucosa en medio Okonkwo, (C) producción de 2,3-BD en medio Häßler, (D) producción de 2,3-BD en medio Okonkwo, (E) producción de acetoina en medio Häßler, y (F) producción de acetoina en medio Okonkwo en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando *P. polymyxa*. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada); 110g/L (asterisco azul); 130 g/L (círculo verde).

Como se observa en la Figura 4.1 A y B, hay un mayor consumo de glucosa en las fermentaciones con medio de crecimiento Häßler que con el medio Okonkwo. Dichas diferencias son más notorias en las fermentaciones llevadas a cabo con una concentración inicial de glucosa de 70 g/L en las que hay un consumo un 37% superior en favor del primer medio (93% de consumo en el Häßler frente a un 56% en el Okonkwo).

En lo referente a la producción del 2,3-BD, el producto principal, los resultados indican también las ventajas del medio Häßler. A excepción de las experiencias con concentración de glucosa de 30 g/L en los que es ligeramente superior la concentración de producto en medio Okonkwo (7,36 frente a 7,09 g/L), en el resto de ensayos se han obtenido concentraciones superiores con el primer medio de crecimiento. De nuevo, usando un sustrato con concentración de 70 g/L se incrementan las diferencias, produciéndose 6,5 g/L más de 2,3-BD, llegando a una concentración máxima de 19 g/L.

Como se recoge en bibliografía, existe una reacción reversible entre el 2,3-BD y la acetoína, desplazándose el equilibrio en función de factores como la agitación y la disponibilidad de oxígeno. Al llevar a cabo los experimentos se ha podido observar que cuando la concentración de azúcar en el medio es baja, comienza a formarse acetoína y a consumirse 2,3-BD, como se observa en la Figura 4.1.

De acuerdo a esta situación, en el momento de mayor concentración de 2,3-BD producido para cada experimento, la concentración de acetoína es inferior en el medio Häßler que en el Okonkwo. Sin embargo, si la fermentación se prolonga por encima de ese tiempo óptimo, los resultados son dispares, habiendo casos en los que la concentración es superior en el Okonkwo y otros en el medio Häßler, con valores en el intervalo de 0,9-6 g/L.

Ambos medios de crecimiento presentan una composición muy similar, aunque varían en el procedimiento de crecimiento del inóculo. Acudiendo a la composición, la principal diferencia es que, mientras el medio Häßler incorpora 10 g/L de extracto de levadura, el Okonkwo combina 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de triptona. Así, las diferencias obtenidas pueden deberse a que la triptona favorece el equilibrio hacia la acetoína o a que una mayor concentración de extracto de levadura lo desplaza hacia la formación de 2,3-BD.

Según bibliografía, un aumento en la concentración de extracto de levadura promueve mayores concentraciones de 2,3-BD usando *P. polymyxa*, ya que de 57 g/L de 2,3-BD con un medio que contenía 5 g/L de extracto de levadura, se aumentó hasta 113 g/L de 2,3-BD con un medio con 60 g/L de extracto [21].

Los resultados óptimos se han alcanzado siempre para tiempos comprendidos entre 24 y 72 h, lo cual concuerda con la información bibliográfica. *Häßler et al.* [21] obtuvieron las mayores concentraciones de 2,3-BD a las 48 h, mientras que *Okonkwo et al.* [22] alcanzaron los mejores valores entre 30 y 80 h.

Los experimentos que han ofrecido las mayores concentraciones de 2,3-BD han sido los que presentan concentraciones de sustrato intermedias, en particular las de 70 y 90 g/L como se observa en la Tabla 4.1. Con el medio Häblier se han logrado unos 19 g/L de 2,3-BD partiendo de 70 g/L de glucosa y con el medio Okonkwo se han obtenido 14 g/L de producto a partir de 90 g/L de sustrato. Los experimentos con concentraciones de sustrato inferiores pueden haber ofrecido peores resultados porque el consumo de azúcares es total y no existe más alimento para los microorganismos, mientras que los de concentraciones elevadas pueden haber provocado inhibición por sustrato, reduciendo la eficacia del proceso.

En la Figura 4.2 se representa la producción de 2,3-BD y el consumo de azúcar frente a la concentración inicial de sustrato, en ambos medios de crecimiento. Como se ha comentado, las concentraciones de producto más altas se observaron en las concentraciones intermedias, al igual que el mayor consumo de glucosa. La productividad más elevada ha sido de 0,37 g/(L·h) y se ha observado usando 30 g/L de glucosa.

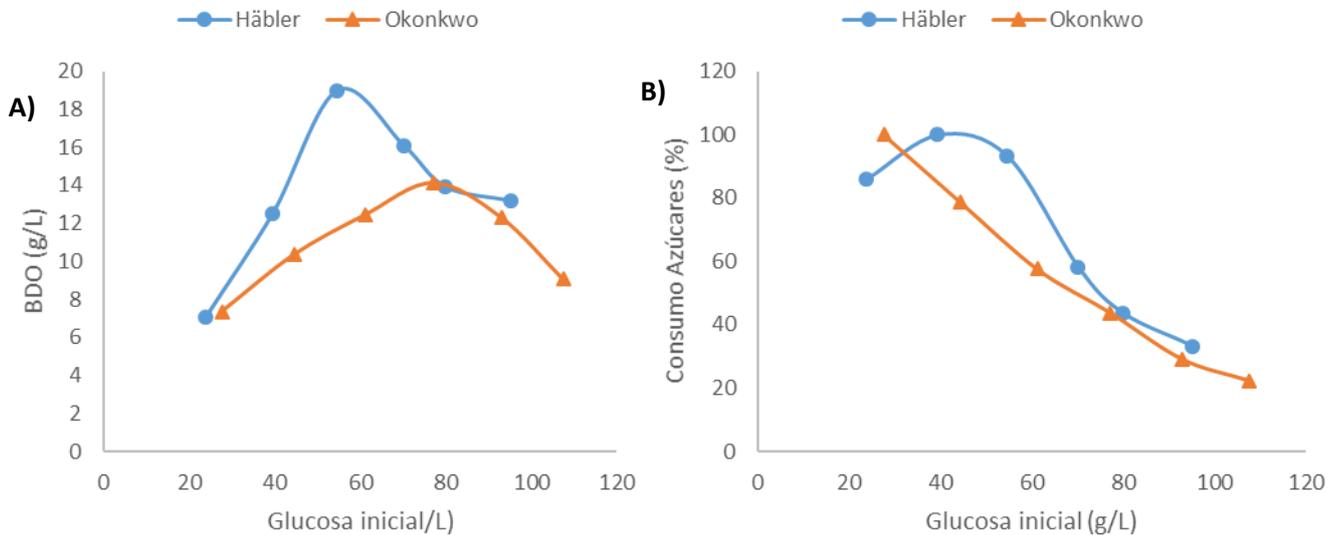


Figura 4.2. Relación entre (A) la producción de 2,3-BD y (B) el consumo de azúcares en tanto por ciento frente a la concentración inicial de glucosa.

Es complicado comparar los resultados obtenidos en este estudio con otras investigaciones porque las condiciones de operación, los sustratos y las composiciones de los medios de fermentación son diferentes. Algunos de los estudios con condiciones similares ofrecen resultados dispares: *Okonkwo et al.* [22] trabajó con una concentración de glucosa de 120 g/L y obtuvo 2,3-BD con concentración entre 45-51 g/L, muy superior a los 14 g/L obtenidos en estos ensayos al trabajar con concentraciones parecidas de sustrato. *Ljubas et al.* [52] llevaron a cabo ensayos con glucosa obteniendo resultados mucho más similares a los de este estudio pues con concentraciones iniciales de glucosa de 30 y 50 g/L obtuvieron 10,6 y 16,26 g/L de 2,3-BD, respectivamente y con 70 g/L (que es la que mejores resultados ofreció, al igual que en este estudio) se consiguieron 18,61 g/L de 2,3-BD con un rendimiento de 0,31 g/g y productividad de 0,22 g/(L·h). En la Tabla 4.1 se recoge un resumen de los resultados obtenidos en las fermentaciones con glucosa obtenidas en este TFM:

Tabla 4.1. Resumen de resultados de fermentaciones con glucosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD (indicados entre paréntesis).

	Concentración inicial de glucosa (g/L)	Consumo de glucosa (g/L) (%)	Rendimiento (g 2,3-BD/g glucosa)	Productividad (g/(L·h))	Concentración máxima de 2,3-BD (g/L)
<b>Medio Häbler</b>	30 (24h)	20,5 (86)	0,35	0,37	7,1
	50 (48h)	39,4 (100)	0,32	0,26	12,5
	70 (72h)	51,0 (93)	0,37	0,26	19,0
	90 (48h)	40,9 (58)	0,39	0,33	16,1
	110 (48h)	34,9 (44)	0,40	0,29	13,9
	130 (72h)	31,6 (33)	0,42	0,18	13,2
<b>Medio Okonkwo</b>	30 (48h)	27,7 (100)	0,27	0,15	7,4
	50 (48h)	35,0 (79)	0,30	0,22	10,3
	70 (48h)	35,2 (58)	0,35	0,26	12,4
	90 (48h)	33,8 (44)	0,42	0,29	14,1
	110 (72h)	27,0 (29)	0,46	0,17	12,3
	130 (72h)	24,0 (22)	0,38	0,13	9,1

#### 4.2. Fermentaciones con medios modelo de azúcares

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en las fermentaciones de fructosa, galactosa y mezclas de azúcares llevadas a cabo con el medio elegido previamente, el medio Häbler.

##### 4.2.1. FERMENTACIONES USANDO FRUCTOSA COMO SUSTRATO

Una vez se ha seleccionado el medio de crecimiento que ofrece mejores resultados, se han llevado a cabo fermentaciones con otros medios modelos diferentes a la glucosa, pero que también forman parte de la composición de la zanahoria y de otros residuos hortofrutícolas. Uno de estos azúcares ha sido la fructosa y se han realizado experimentos con concentraciones iniciales de 30,50,70,90,110 y 130 g/L a 37 °C y 200 rpm. En la Figura 4.3 se muestra la evolución en el consumo de fructosa y en la producción de 2,3-BD y acetoína.

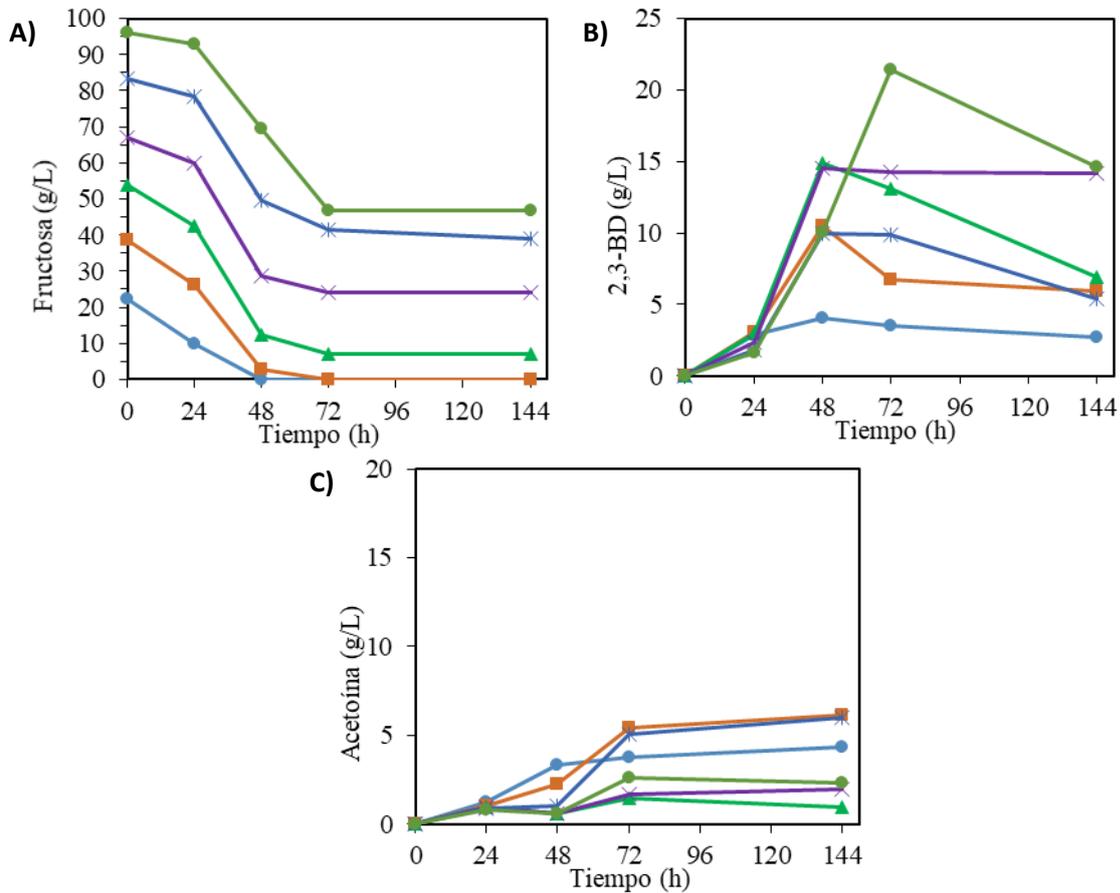


Figura 4.3. Evolución de (A) consumo de fructosa, (B) producción de 2,3-BD, (C) producción de acetoina en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando *P. polymyxa* y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada); 110g/L (asterisco azul); 130 g/L (círculo verde).

Los consumos de sustrato son del 100% para las experiencias de menor concentración (30 y 50 g/L) y prácticamente total para la de 70 g/L, siendo esta la que más azúcares consume (disminuye la concentración en 46,7 g/L desde las 0 a las 144 h) y el que mayor productividad ofrece (0,31 g/L·h). El pico de concentración máxima de producto se da a las 72 h para la fermentación de 130 g/L con un valor de 21,4 g/L de 2,3-BD. Sin embargo, dicha concentración disminuye con el tiempo y se iguala con los resultados del experimento llevado a cabo con una concentración inicial de 90 g/L de fructosa. Dicha fermentación de 90 g/L es la que ofrece mejor rendimiento (0,38 g 2,3-BD/g fructosa), siendo seguramente la que menores inhibiciones provoca.

La producción de acetoina presenta, en casi todos los casos, un incremento muy importante a partir de las 48 h, debido a la transformación de 2,3-BD en este subproducto. Los resultados obtenidos con la acetoina concuerdan y reafirman que los ensayos que mejores resultados ofrecen son los de 90 y 130 g/L.

En todos los casos, a partir de las 72 h de proceso, el consumo de azúcares es prácticamente nulo. Como se observa en la Tabla 4.2, a excepción de la fermentación llevada a cabo con 90 g/L de fructosa que llega a la máxima concentración de 2,3-BD a las 72 h, el resto de experiencias tienen resultados óptimos a las 48 h (momento en el que debería finalizarse el proceso) y, desde ese instante, comienza a decrecer la

concentración de producto y a aumentar la de acetoína. Los tiempos óptimos coinciden con los obtenidos para la glucosa.

En bibliografía hay muy pocos experimentos con fructosa por lo que se compara con resultados obtenidos usando glucosa como sustrato. La máxima concentración de 2,3-BD obtenida es superior a la conseguida en los ensayos con glucosa (21,4 g/L con fructosa y 19 g/L con glucosa) aunque la concentración del sustrato empleada en el caso de la fructosa es mayor a la de glucosa. Pese a que la mayor concentración se consigue con los experimentos con fructosa, la productividad más alta se ha alcanzado trabajando con glucosa (0,31 frente a 0,37 g/(L·h)). En cuanto a los rendimientos, los valores no varían demasiado, siendo casi siempre cercanos a los 0,35 g/g. En la Tabla 4.2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

*Tabla 4.2. Resumen de resultados de fermentaciones con fructosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD (indicados entre paréntesis).*

	Concentración inicial de fructosa (g/L)	Consumo de fructosa (g/L) (%)	Rendimiento (g 2,3-BD/g fructosa)	Productividad (g/(L·h))	Concentración máxima de 2,3-BD (g/L)
<b>Medio Häßler</b>	30 (48h)	22,4 (100)	0,18	0,08	4,1
	50 (48h)	35,9 (93)	0,29	0,22	10,5
	70 (48h)	41,5 (77)	0,36	0,31	14,9
	90 (48h)	38,3 (57)	0,38	0,30	14,5
	110 (48h)	33,6 (40)	0,30	0,21	10,0
	130 (72h)	49,5 (51)	0,33	0,30	21,4

#### 4.2.2. FERMENTACIONES USANDO GALACTOSA COMO SUSTRATO

La galactosa es otro de los azúcares presentes en los hidrolizados de zanahoria y de otros residuos hortofrutícolas. Como su concentración en la zanahoria es inferior a la de la glucosa y la fructosa, los experimentos se han llevado a cabo usando un intervalo de concentración menor: 30, 50, 70 y 90 g/L. Las condiciones de operación han sido 37 °C, 200 rpm y usando el medio de crecimiento Häßler. En la Figura 4.4. se muestra la evolución en el consumo de galactosa y en la producción de 2,3-BD y acetoína.

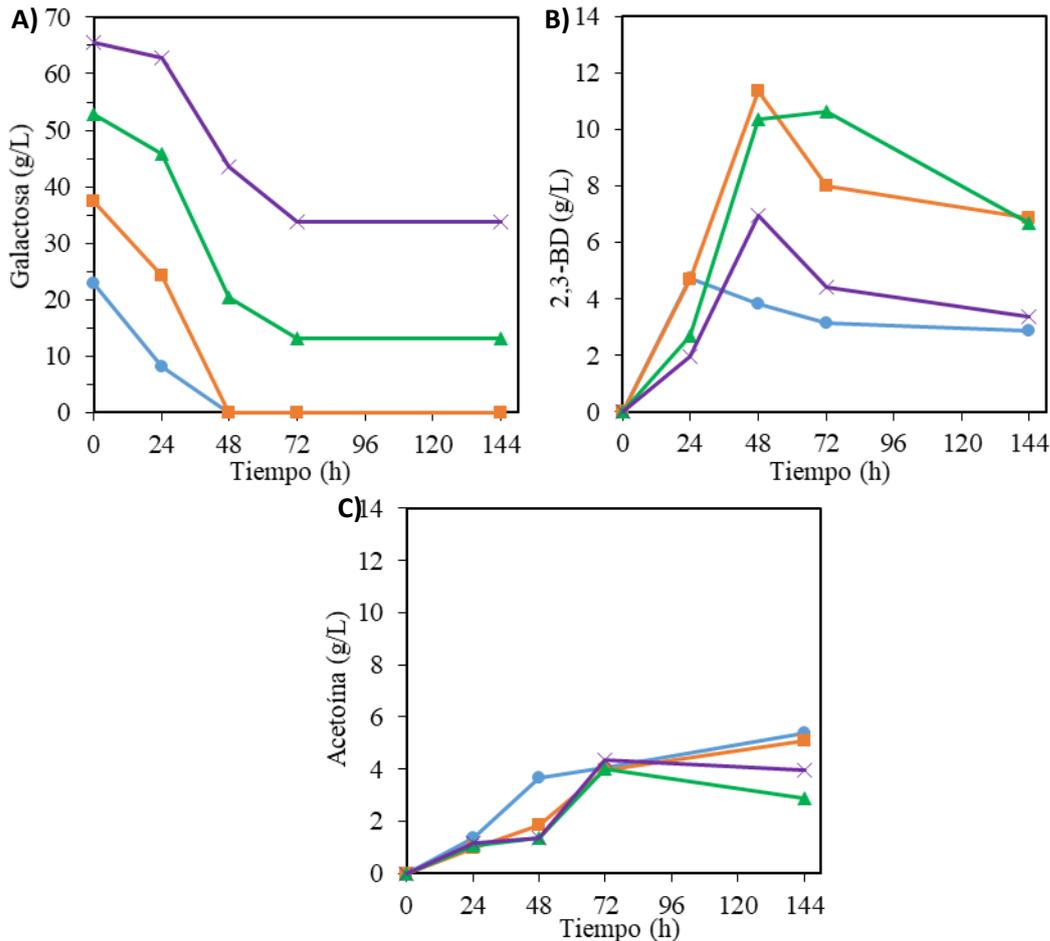


Figura 4.4. Evolución de (A) consumo de galactosa, (B) producción de 2,3-BD, (C) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando *P. polymyxa* y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm. Leyenda: 30 g/L (círculo azul); 50 g/L (cuadrado naranja); 70 g/L (triángulo verde); 90 g/L (cruz morada).

Las experiencias llevadas a cabo con 30 y 50 g/L presentan un consumo de sustrato del 100%, mientras que las de 70 y 90 g/L alcanzan un consumo de azúcares del 75 y 49%, respectivamente, a las 144 h de fermentación. La máxima productividad de 2,3-BD se alcanza en la fermentación con 50 g/L y a las 48 h con un valor de 0,24 g/(L·h) ya que consume más sustrato en el mismo tiempo que la experiencia llevada a cabo con 30 g/L.

Al igual que con la productividad, la concentración de producto se maximiza a las 48 h para la fermentación llevada a cabo con 50 g/L de galactosa con un valor de 11,5 g/L de 2,3-BD. Durante las siguientes horas, las concentraciones obtenidas en este ensayo disminuyen y es la fermentación de 30 g/L la que ofrece mejores resultados.

En todos los casos, la concentración de acetoína aumenta hasta las 72 h. En este punto, las fermentaciones que ofrecen menores concentraciones de 2,3-BD generan, también, concentraciones más bajas de acetoína. Esta situación difiere a las anteriores en las que una alta concentración de 2,3-BD suponía una baja concentración de acetoína.

Ciertos resultados concuerdan con los obtenidos al trabajar con fructosa, Por ejemplo, el consumo de azúcares cesa hacia las 72 h. Las concentraciones máximas de

2,3-BD se observan a las 48 h, a excepción del experimento de menor carga de azúcares que es a las 24 h.

La concentración máxima obtenida usando galactosa como sustrato (11,5 g/L) ha sido bastante inferior a las obtenidas con fructosa y con glucosa (18,9 y 21,4 g/L, respectivamente) lo que indica que el microorganismo tiene preferencia por los otros monosacáridos. En términos de productividad, la galactosa tampoco ofrece buenos resultados ya que es con la que se obtienen menores concentraciones de 2,3-BD. Los rendimientos también son un poco inferiores en este caso, ya que no se mantienen en los 0,32 g/g. En la Tabla 4.3 se muestra un resumen de los resultados:

Tabla 4.3. Resumen de resultados de fermentaciones con galactosa, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.

	Concentración inicial de galactosa (g/L)	Consumo de galactosa (g/L) (%)	Rendimiento (g 2,3-BD/g galactosa)	Productividad (g/(L·h))	Concentración máxima de 2,3-BD (g/L)
<b>Medio Häßler</b>	30 (24h)	14,7 (64)	0,32	0,20	4,8
	50 (48h)	37,4 (100)	0,30	0,24	11,4
	70 (48h)	32,6 (62)	0,32	0,22	10,3
	90 (48h)	22,1 (34)	0,31	0,14	6,9

#### 4.2.3. FERMENTACIONES USANDO DISOLUCIONES DE AZÚCARES

Por último, para asemejar las fermentaciones con medios modelos a la composición del hidrolizado de zanahoria, se han utilizado disoluciones de azúcares como sustrato ya que el medio real contiene tanto glucosa como fructosa y galactosa. Se han preparado dos mezclas y en ambas el azúcar principal es la glucosa acompañada de otro de los monosacáridos ya estudiados, fructosa y galactosa. Así, se ha preparado una fermentación con una mezcla de glucosa y fructosa con concentraciones de 40 y 20 g/L, respectivamente y una fermentación de glucosa y galactosa con concentración de 40 y 20 g/L, respectivamente. En la Figura 4.5. se muestra por separado la evolución en el consumo de monosacáridos, así como la producción de 2,3-BD y acetoína para cada mezcla.

En la Figura 4.5 se puede observar como para *P. polymyxa* la glucosa es el sustrato preferente ya que es el primero que consume. En ambas experiencias, a las 48 h la glucosa se ha consumido prácticamente por completo, mientras que la fructosa y, en especial, la galactosa no se consumen durante la fermentación.

La concentración máxima de 2,3-BD se da a las 48 h para la disolución de glucosa y galactosa (11,5 g/L) y a las 72 h para la disolución de glucosa y fructosa (13,7 g/L), ofreciendo esta segunda valores más elevados hasta las 96 h, pero disminuyendo drásticamente después. Esta mezcla de azúcares ofrece resultados bastante similares a las fermentaciones llevadas a cabo con 50 g/L de glucosa (concentración máxima de

12,6 g/L), pero peores que las fermentaciones realizadas con 70 y 90 g/L de glucosa (19 y 16 g/L de 2,3-BD, respectivamente), pese a que la concentración inicial de azúcares es similar. Por tanto, la presencia de los otros monosacáridos parece afectar negativamente a la concentración de producto, ofreciendo resultados similares al ensayo que tiene la misma concentración de glucosa, lo que puede indicar que este sea el único monosacárido que fermenta correctamente. La producción de acetoína ha sido superior usando la mezcla de monosacáridos como sustrato que en cualquiera de las experiencias previas realizadas solo con glucosa, lo cual es también negativo. Las productividades de las dos mezclas son de 0,24 g/(L·h) para la que contiene galactosa y de 0,19 g/(L·h) para la que contiene fructosa, siendo ambas inferiores a la máxima obtenida en las experiencias realizadas usando sólo glucosa como sustrato (0,37 g/(L·h)), pero siendo también inferiores a las del resto de fermentaciones solo con glucosa (oscilan entre 0,26 y 0,34 g/(L·h)). En la Tabla 4.4 se muestra un resumen de los resultados.

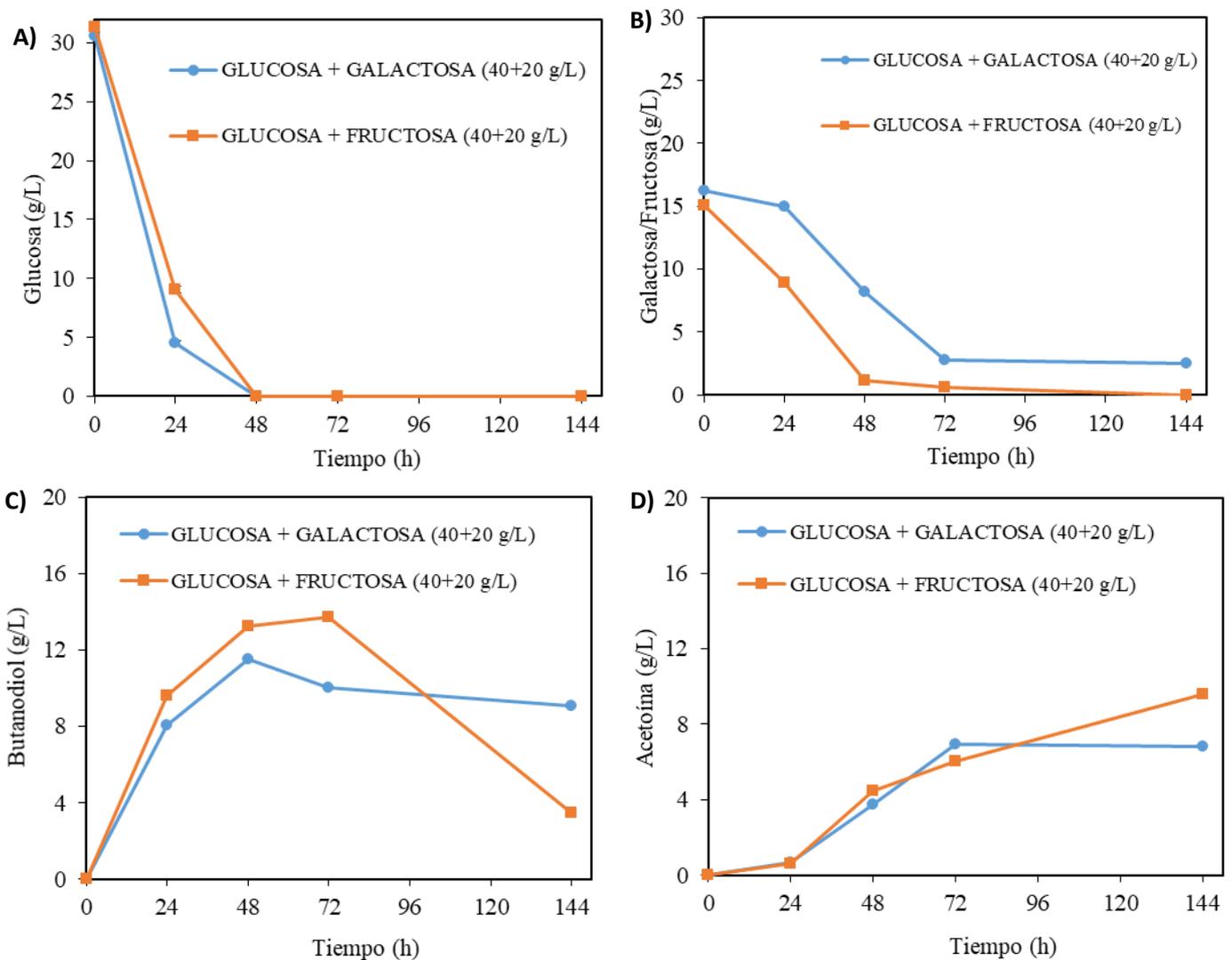


Figura 4.5. Evolución de (A) consumo de glucosa, (B) consumo de galactosa/fructosa, (C) producción de 2,3-BD y (D) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando *P. polymyxa* y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C y 200 rpm.

Tabla 4.4. Resumen de resultados de fermentaciones con disoluciones de azúcares, 200 rpm y 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.

	<b>Glucosa + Galactosa</b>	<b>Glucosa + Fructosa</b>
<b>Concentración inicial de azúcares (g/L)</b>	40 + 20 (48h)	40 + 20 (72h)
<b>Consumo de glucosa (g/L) (%)</b>	30,6 (65)	31,4 (66)
<b>Consumo de galactosa/fructosa (g/L)</b>	13,7 (52)	15,0 (80)
<b>Consumo total (g/L)</b>	44,3 (59)	46,4 (72)
<b>Rendimiento total (g 2,3-BD/g azúcar total)</b>	0,30	0,30
<b>Productividad (g 2,3-BD/(L·h))</b>	0,24	0,19
<b>Concentración máxima de 2,3-BD (g/L)</b>	11,5	13,7

### 4.3. Fermentaciones con hidrolizado de zanahoria.

Una vez se ha trabajado con los diferentes medios modelos para recopilar información de las características del microorganismo (medio de cultivo óptimo, sustrato preferente), se llevaron a cabo ensayos de fermentación con hidrolizados reales, procedentes de residuos hortofrutícolas. En este caso, el medio real se trata de un hidrolizado enzimático de destrío de zanahoria que ha sido obtenido tal y como se explicó previamente en el apartado 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Con el objetivo de determinar la influencia de la velocidad de agitación en el proceso, es decir, si favorece la formación de 2,3-BD o de acetoína, se han realizado experiencias a 100, 200 y 300 rpm. Como experimento base se usa el de 200 rpm ya que esa es la agitación usada en todos los experimentos previos. EL hidrolizado de zanahoria presenta en su composición no sólo glucosa, fructosa y galactosa, sino que también tiene arabinosa (aunque en concentraciones muy pequeñas), por lo que en los resultados van a presentarse por separado el consumo de cada uno de ellos (agrupando fructosa, galactosa y arabinosa). En la Figura 4.6 se presenta la evolución en el consumo de glucosa, galactosa más fructosa más arabinosa y en la producción de 2,3-BD y acetoína.

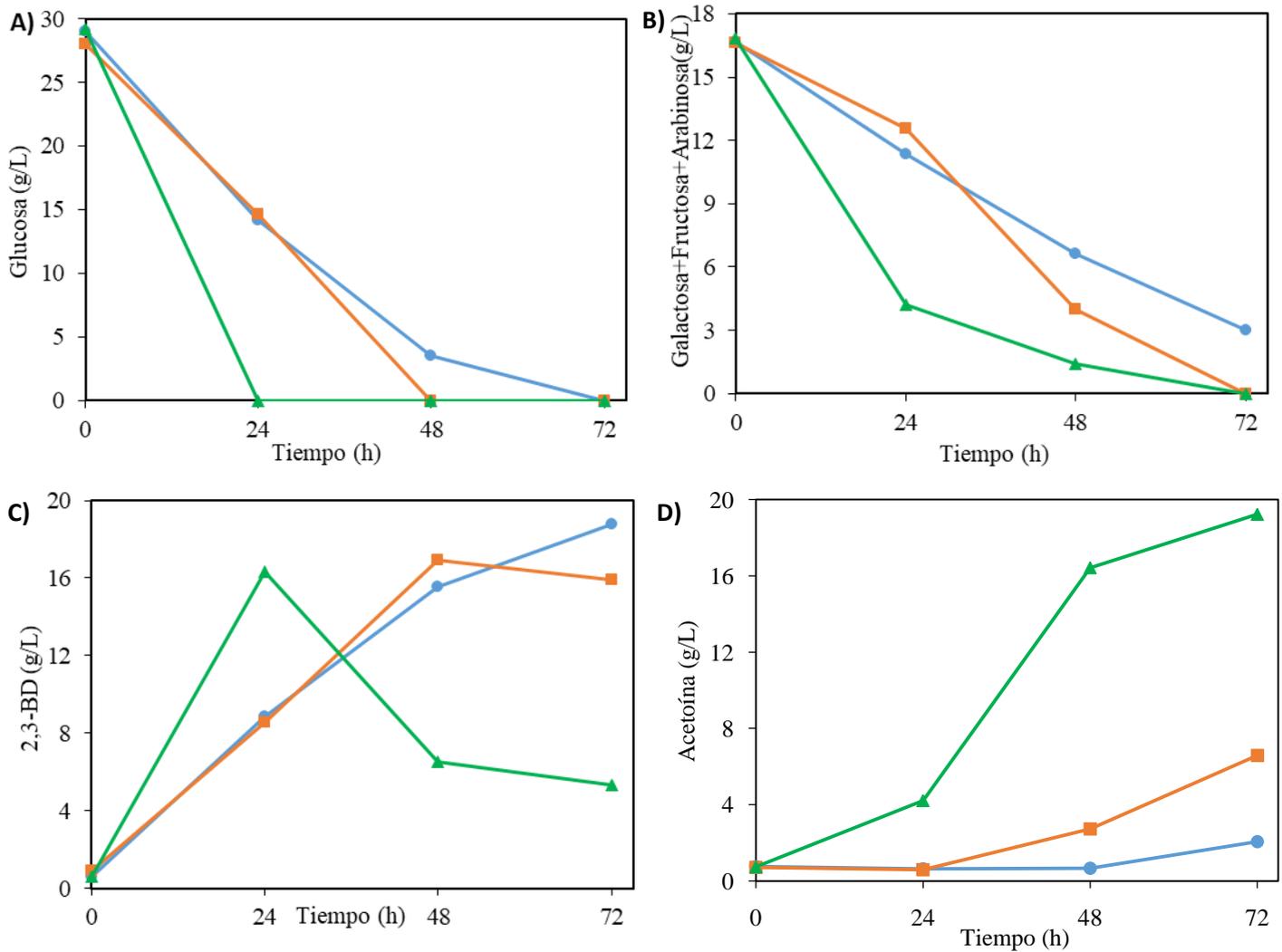


Figura 4.6. Evolución de (A) consumo de glucosa, (B) consumo de galactosa, fructosa y arabinosa (C) producción de 2,3-BD y (D) producción de acetoína en fermentaciones en régimen discontinuo utilizando *P. polymyxa* y medio de crecimiento Häßler. Condiciones de operación: 37 °C. Leyenda: 100 rpm (círculo azul); 200 rpm (cuadrado naranja); 300 rpm (triángulo verde)

Todos los resultados que se pueden ver en la Figura 4.6 demuestran que la fermentación llevada a cabo a mayor velocidad de agitación presenta una evolución más rápida, es decir que se consumen antes todos los azúcares, se produce antes la mayor concentración de 2,3-BD y, a su vez, este producto comienza a transformarse en acetoína antes.

En lo referente al consumo de azúcares, estas fermentaciones muestran el mismo comportamiento que las de medios modelo puesto que la glucosa es el azúcar que primero asimila *P. polymyxa*, siendo el único monosacárido que es consumido en su totalidad en las tres experiencias. El resto de azúcares fermentables tardan más en consumirse completamente para los experimentos de 200 y 300 rpm, mientras que para el de 100 rpm el consumo no es completo, solo del 80%. Para la arabinosa, que es el azúcar en menor concentración, ocurre lo mismo y no llega a consumirse en la fermentación más lenta.

A las 24 h, la fermentación de 300 rpm llega a su máximo de concentración de 2,3-BD (16,3 g/L), el cual es bastante próximo a los máximos obtenidos con las otras velocidades de agitación. Sin embargo, en las siguientes horas la concentración de producto disminuye mucho y se transforma en acetoína, llegando a las 72 h a un valor muy elevado de 19,2 g/L (mucho más alto que los observados con los medios modelo). Las fermentaciones de 200 y 100 rpm se comportan de forma bastante similar, alcanzando los máximos de 2,3-BD a las 48 y 72 h, respectivamente (16,90 y 18,76 g/L). En ambos casos los valores de acetoína se parecen más a los obtenidos en experiencias previas y aumentan con el tiempo (6,58 y 2,06 g/L). En líneas generales, la concentración máxima de producto es muy parecida, independientemente de la velocidad de agitación, pero no es así el consumo de azúcares ni la generación de acetoína. Sin duda, la fermentación a 300 rpm debe detenerse a las 24 h ya que es cuando mejores resultados ofrece, mientras que, sobre todo la de 100 rpm, debe continuar hasta las 72 h.

A su vez, comparando experiencias llevadas a cabo en las mismas condiciones de operación, a 200 rpm y 37 °C, las fermentaciones con fructosa son las que mejores resultados han ofrecido (21,38 g/L), seguida de la glucosa (18,80 g/L) y por último la del hidrolizado de zanahoria (16,90 g/L). Por tanto, y como ya se ha comentado, la presencia en el medio de fermentación de diferentes azúcares dificulta la acción del microorganismo. Pese a que no hay muchos estudios al respecto, en bibliografía también se ha encontrado que la presencia de fructosa junto a glucosa no mejora las concentraciones máximas de 2,3-BD [23]. Existen pocas experiencias trabajando con hidrolizados en bibliografía, pero los que hay presentan datos ciertamente similares: con otra cepa de *P. polymyxa* e hidrolizado de celulosa se han logrado 16,5 g/L de 2,3-BD y un rendimiento de 0,33 g/g [38]. En la Tabla 4.5 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 4.5. Resumen de resultados de fermentaciones con hidrolizado de zanahoria, variando la velocidad de agitación, 37 °C en los tiempos de máxima concentración de 2,3-BD.

Velocidad de agitación (rpm)	100 (72h)	200 (48h)	300 (24h)
Concentración inicial de azúcares (g/L)	47,1	46,2	47,5
Consumo de glucosa (g/L) (%)	29 (100)	28 (100)	29,2 (100)
Consumo de galactosa/fructosa/arabinosa (g/L) (%)	14,5 (80)	14,1 (78)	14,1 (77)
Consumo total (g/L) (%)	43,5 (93)	42,1 (92)	43,3 (93)
Rendimiento total (g 2,3-BD/g azúcar total)	0,43	0,40	0,38
Productividad (g 2,3-BD/(L·h))	0,26	0,35	0,68
Concentración máxima de 2,3-BD (g/L)	18,8	16,9	16,3
Ratio 2,3-BD/Acetoína	9,2	6,2	3,9

Como se ha comentado previamente en la introducción y como refleja la bibliografía, un aumento de la velocidad de agitación ocasiona, a su vez, una mayor aireación. Esta aireación propicia que el equilibrio acetoína  $\leftrightarrow$  2,3-BD se vea desplazado más marcadamente hacia la acetoína. Así, para el experimento de 300 rpm, en las primeras 24 h se genera una elevada concentración de producto (16,3 g/L de 2,3-BD), pero después la concentración de acetoína alcanza el máximo valor registrado en todas estas experiencias (19,2 g/L). El control de la generación de acetoína dependería de ajustar el tiempo de operación al tiempo óptimo o de llevar a cabo fermentaciones a menor velocidad de agitación.

## 5. CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las principales conclusiones obtenidas tras la realización de este TFM a cerca de la producción de 2,3-BD a partir de residuos hortofrutícolas.

Los resultados que se han obtenido experimentalmente muestran que la fermentación, en régimen discontinuo, tanto de disoluciones de azúcares puros, de disoluciones de mezcla de azúcares y de hidrolizado de zanahoria con el microorganismo *P. polymyxa* generan como producto principal 2,3-BD. Las máximas concentraciones que se han alcanzado han sido de 21,4 y de 19 g/L, empleando como sustrato fructosa con concentración 130 g/L (rendimiento de 0,33 g/g y productividad de 0,3 g/(L·h)) y glucosa con concentración de 70 g/L (rendimiento de 0,37 g/g y productividad de 0,26 g/(L·h)).

Los mejores resultados obtenidos se han dado cuando se utilizan disoluciones en las que sólo hay un tipo de monosacárido, fructosa o glucosa (excepto cuando se usó galactosa como sustrato). Tanto las disoluciones con mezcla de azúcares como el hidrolizado de zanahoria han ofrecido menores concentraciones máximas, menores rendimientos y menores productividades que las experiencias llevadas a cabo con un único sustrato cuando se han llevado a cabo en las mismas condiciones de operación.

En cuanto a las condiciones de operación analizadas, el medio de crecimiento *Häßler* ha ofrecido mejores resultados que el medio de crecimiento *Okonkwo*. La principal diferencia entre ambos es que el primero presenta una mayor concentración de extracto de levadura, mientras que el segundo incluye triptona, por lo que uno de esos dos compuestos tiene un cierto impacto en la fermentación, siendo necesario un análisis con mayor detalle en futuras investigaciones. El análisis de la influencia de la velocidad de agitación en fermentaciones con hidrolizado de zanahoria ha demostrado que una mayor velocidad de agitación supone más velocidad de reacción, pero también favorece que el equilibrio 2,3-BD  $\leftrightarrow$  acetoína se desplace hacia el segundo. Los tiempos óptimos de operación han estado en todos los casos comprendidos en el intervalo entre las 24 y 72 h. Una vez llevado a cabo este TFM se puede concluir que la valorización de residuos hortofrutícolas mediante la obtención de 2,3-BD, en particular del destrío de zanahoria, es una alternativa viable y factible, pero aún existen múltiples factores a analizar en futuras investigaciones como la influencia de cada componente del medio de cultivo o las vías para desplazar completamente el equilibrio a favor del 2,3-BD.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Xie, Z. Li, G. Zhu, W. Song, and C. Yi, "Cleaner production and downstream processing of bio-based 2,3-butanediol: A review," *J. Clean. Prod.*, vol. 343, no. February, p. 131033, 2022.
- [2] R. Mitsui, R. Yamada, T. Matsumoto, and H. Ogino, "Bioengineering for the industrial production of 2,3-butanediol by the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, no. 3, pp. 1–12, 2022.
- [3] G. R. Harvianto *et al.*, "Purification of 2,3-butanediol from fermentation broth: process development and techno-economic analysis," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, p. 18, 2018.
- [4] S. K. Garg and A. Jain, "Fermentative production of 2,3-butanediol: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 103–109, 1995.
- [5] "2,3-Butanediol: Información fisicoquímica," *MERCK*. [Online]. Available: [https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/23-Butanediol,MDA\\_CHEM-818801](https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/23-Butanediol,MDA_CHEM-818801). [Accessed: 01-Apr-2022].
- [6] K. Petrov, "Current Advances in Microbial Production of Acetoin and 2,3-Butanediol by *Bacillus* spp.," pp. 1–24, 2021.
- [7] A. M. Białkowska, "Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 12, p. 200, Dec. 2016.
- [8] S.-J. Kim, J.-W. Kim, Y.-G. Lee, Y.-C. Park, and J.-H. Seo, "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 2,3-butanediol production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 6, pp. 2241–2250, Mar. 2017.
- [9] "2,3-Butanediol Market (Application: Intermediate Chemicals, Plastics, Food Additives, Cosmetics and others)-Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2020–2030," *Chemicals & Materials, Market Research Report*, 2020. [Online]. Available: <https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html>. [Accessed: 31-Mar-2022].
- [10] M. Köpke *et al.*, "2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 15, pp. 5467–5475, Aug. 2011.
- [11] H. Gräfe *et al.*, "Butanediols, Butenediol, and Butynediol," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
- [12] X.-J. Ji *et al.*, "Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 21, pp. 5214–5218, Nov. 2009.
- [13] "Precio del petróleo OPEP por barril," *Datosmacro.com*, 2022. [Online]. Available: <https://datosmacro.expansion.com/materias-primas/opec>. [Accessed:

13-Jun-2022].

- [14] X.-J. Ji, H. Huang, and P.-K. Ouyang, "Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 351–364, 2011.
- [15] E. Celińska and W. Grajek, "Biotechnological production of 2,3-butanediol--current state and prospects.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 6, pp. 715–725, 2009.
- [16] P. Perego, A. Converti, and M. Del Borghi, "Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*," *Bioresour. Technol.*, vol. 89, no. 2, pp. 125–131, 2003.
- [17] B. Sikora *et al.*, "Application of byproducts from food processing for production of 2,3-butanediol using *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 46, no. 6, pp. 610–619, Aug. 2016.
- [18] C. Rode, R. Parate, and M. Dharne, "2,3-Butanediol Production from Biodiesel Derived Glycerol," *Curr. Environ. Eng.*, vol. 05, Jan. 2018.
- [19] L. Li *et al.*, "Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain.," *Bioresour. Technol.*, vol. 170, pp. 256–261, Oct. 2014.
- [20] K. Ma *et al.*, "Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation," *Chem. Eng. J.*, vol. 332, pp. 361–369, 2018.
- [21] T. Häßler, D. Schieder, R. Pfaller, M. Faulstich, and V. Sieber, "Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365.," *Bioresour. Technol.*, vol. 124, pp. 237–244, Nov. 2012.
- [22] C. C. Okonkwo, V. C. Ujor, P. K. Mishra, and T. C. Ezeji, "Process Development for Enhanced 2,3-Butanediol Production by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365," *Fermentation*, vol. 3, no. 2, 2017.
- [23] Y. Nakashimada, B. Marwoto, T. Kashiwamura, T. Kakizono, and N. Nishio, "Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 90, no. 6, pp. 661–664, 2000.
- [24] S. Cho, T. Kim, H. M. Woo, Y. Kim, J. Lee, and Y. Um, "High production of 2,3-butanediol from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1.," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, p. 146, 2015.
- [25] I.-M. Jurchescu *et al.*, "Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 15, pp. 6715–6723, Aug. 2013.
- [26] Y. Ge *et al.*, "Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*," *Green Chem.*, vol. 18, no. 17, pp. 4693–4703, 2016.
- [27] Y. Zhang, S. Li, L. Liu, and J. Wu, "Acetoin production enhanced by manipulating carbon flux in a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens*," *Bioresour. Technol.*,

- vol. 130, pp. 256–260, Feb. 2013.
- [28] P. Petrova, S. Petlichka, and K. Petrov, “New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass.,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 130, no. 1, pp. 20–28, Jul. 2020.
- [29] M. Kallbach, S. Horn, A. Kuenz, and U. Prüße, “Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 3, pp. 1025–1033, 2017.
- [30] J.-J. Dai, J.-S. Cheng, Y.-Q. Liang, T. Jiang, and Y.-J. Yuan, “Regulation of extracellular oxidoreduction potential enhanced (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* CJX518.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 167, pp. 433–440, Sep. 2014.
- [31] N. Adlakha and S. S. Yazdani, “Efficient production of (R,R)-2,3-butanediol from cellulosic hydrolysate using *Paenibacillus polymyxa* ICGEB2008.,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 42, no. 1, pp. 21–28, Jan. 2015.
- [32] J. Fu *et al.*, “NADH plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 111, no. 10, pp. 2126–2131, Oct. 2014.
- [33] T. Yang, Z. Rao, X. Zhang, M. Xu, Z. Xu, and S.-T. Yang, “Improved production of 2,3-butanediol in *Bacillus amyloliquefaciens* by over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 2,3-butanediol dehydrogenase.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76149, 2013.
- [34] J. Gao, H. Xu, Q. Li, X. Feng, and S. Li, “Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R,R-2,3-butanediol.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 18, pp. 7087–7093, Sep. 2010.
- [35] D. Raspoet, B. Pot, D. De Deyn, P. De Vos, K. Kersters, and J. De Ley, “Differentiation Between 2,3-Butanediol Producing *Bacillus licheniformis* and *B. polymyxa* Strains by Fermentation Product Profiles and Whole-Cell Protein Electrophoretic Patterns,” *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, 1991.
- [36] S. Maina *et al.*, “Improvement on bioprocess economics for 2,3-butanediol production from very high polarity cane sugar via optimisation of bioreactor operation.,” *Bioresour. Technol.*, vol. 274, pp. 343–352, Feb. 2019.
- [37] J. Moes, M. Griot, J. Keller, E. Heinzle, I. J. Dunn, and J. R. Bourne, “A microbial culture with oxygen-sensitive product distribution as a potential tool for characterizing bioreactor oxygen transport.,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 27, no. 4, pp. 482–489, Apr. 1985.
- [38] K. Zhang, L.; Chen, S.; Xie, H.; Tian, Y.; Hu, “Efficient acetoin production by optimization of medium components and oxygen supply control using a newly isolated *Paenibacillus polymyxa* CS107,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 87, pp. 1551–1557, 2012.
- [39] P. Singh nee’ Nigam, “Production of Bioactive Secondary Metabolites,”

- Biotechnol. Agro-Industrial Residues Util.*, pp. 129–145, 2009.
- [40] Y.-H. P. Zhang, “Reviving the Carbohydrate Economy Via Multi-Product Lignocellulose Biorefineries,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, pp. 367–375, May 2008.
- [41] M. C. Villarán, M. Chávarri, T. Dietrich, and E. Rodríguez, “Subproductos hortofrutícolas para una bioeconomía circular,” *Mediterráneo Económico*, vol. 31, pp. 251–272, 2018.
- [42] C. Conesa Domínguez, “Aprovechamiento de residuos en la industria hortofrutícola,” in *Curso de tecnología poscosecha de cítricos y otros cultivos en la Comunidad Valenciana*, 2018.
- [43] C. D. Grande Tovar, “Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales,” Universidad de San Buenaventura de Cali, 2016.
- [44] G. J. Kaur, V. Orsat, and A. Singh, “Challenges and potential solutions to utilization of carrot rejects and waste in food processing,” *Br. Food J.*, vol. 123, no. 6, pp. 2036–2048, Jan. 2021.
- [45] V. Šeregelj, J. Vulić, G. Četković, J. Čanadanovć-Brunet, V. Tumbas Šaponjac, and S. Stajčić, “Chapter 9 - Natural bioactive compounds in carrot waste for food applications and health benefits,” in *Bioactive Natural Products*, vol. 67, B. T.-S. in N. P. C. Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier, 2020, pp. 307–344.
- [46] V. T. Nguyen and C. J. Scarlett, “Mass Proportion, Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Carrot Peel as Affected by Various Solvents,” *Technologies*, vol. 4, no. 4. 2016.
- [47] M. Ramos-Andrés, B. Aguilera-Torre, and J. García-Serna, “Biorefinery of discarded carrot juice to produce carotenoids and fermentation products,” *J. Clean. Prod.*, vol. 323, p. 129139, 2021.
- [48] A. M. I. Encalada, C. D. Pérez, S. K. Flores, L. Rossetti, E. N. Fissore, and A. M. Rojas, “Antioxidant pectin enriched fractions obtained from discarded carrots (*Daucus carota* L.) by ultrasound-enzyme assisted extraction,” *Food Chem.*, vol. 289, pp. 453–460, 2019.
- [49] A. Clementz, P. A. Torresi, J. S. Molli, D. Cardell, E. Mammarella, and J. C. Yori, “Novel method for valorization of by-products from carrot discards,” *LWT*, vol. 100, pp. 374–380, 2019.
- [50] A. Mateo, “Sacarificación de residuos hortofrutícolas para la obtención de productos de alto valor añadido mediante procesos de fermentación,” Universidad de Valladolid, 2022.
- [51] D.-K. Kim, J. M. Park, H. Song, and Y. K. Chang, “Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 114, pp. 94–100, 2016.
- [52] Z. Kelemen *et al.*, “Production of Different Biochemicals by *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 From Pretreated Brewers’ Spent Grains,” vol. 13, no. March,

pp. 1–16, 2022.