



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES  
Grado en Ingeniería Química**

**Diseño de procesos para la extracción y  
purificación de ectoína producida por  
microorganismos.**

**Autor:**

**Salgado Herreras, Pedro.**

**Tutor:**

**Bolado Rodríguez, Silvia.  
Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnología del Medio  
Ambiente.**

**Valladolid, julio 2023.**



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## 1. RESUMEN.

En este trabajo se ha planteado el diseño de una planta demostración para la optimización del proceso de obtención y purificación de ectoína producida por bacterias metanótrofas alimentadas con residuos, partiendo de resultados experimentales obtenidos en el laboratorio y referencias bibliográficas. El diseño se ha realizado para una producción de 20 kg ectoína/año.

El proceso consta de dos etapas principales. En la primera de ellas se extrae la ectoína de las bacterias mediante un bio-milking con agua, mientras que en la segunda se procede a purificar la ectoína extraída.

La purificación consta de una centrifugación inicial para separar la biomasa de la disolución de ectoína, seguido de una electrodiálisis para eliminar las sales, presentes en elevada concentración en el medio de cultivo. A continuación, se acidifica la disolución desalinizada para ionizar la ectoína y se pasa por una columna de intercambio iónico donde queda retenida. La ectoína adsorbida se eluye con una disolución de NaOH 1,3 M, se neutraliza con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se concentra por evaporación hasta un 95% en masa. Se añaden 10 kg metanol/kg ectoína para precipitar los sulfatos, y el líquido filtrado se lleva a un cristalizador evaporativo. El metanol residual se seca para obtener el producto final: ectoína purificada al 95%.

El proyecto incluye trabajo experimental, un diseño preliminar de la planta demostración y el diseño de algunos de los equipos, como la columna de intercambio iónico. Se ha realizado además un estudio de la viabilidad económica, incluyendo los diferentes escenarios ante la variación del precio de venta.

## 2. ABSTRACT.

In this work, the design of a demonstration plant for the optimisation of the process of obtaining and purifying ectoine produced by methanotrophic bacteria fed with waste has been proposed, based on experimental results obtained in the laboratory and bibliographic references. The design has been carried out for a production of 20 kg ectoine/year.

The process consists of two main steps. In the first step, the ectoine is extracted from the bacteria by bio-milking with water, while in the second step, the extracted ectoine is purified.

Purification consists of an initial centrifugation to separate the biomass from the ectoine solution, followed by electrodialysis to remove the salts, which are present in high concentration in the culture medium. The desalted solution is then acidified to ionise the ectoine and passed through an ion exchange column where it is retained. The adsorbed ectoine is eluted with a 1,3 M NaOH solution, neutralised with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated by evaporation to 95 % by mass. 10 kg methanol/kg ectoine is added to precipitate the sulphates, and the filtered liquid is taken to an evaporative crystalliser. The residual methanol is dried to obtain the final product: 95% purified ectoine.

The project includes experimental work, a preliminary design of the demonstration plant and the design of some of the equipment, such as the ion exchange column. An economic feasibility study has also been carried out, including different scenarios for the variation of the selling price.

## 3. PALABRAS CLAVE.

Valorización, salinidad, cristalización, intercambio iónico, evaporación.

## 4. KEYWORDS.

Valorisation, salinity, crystallisation, ion exchange, evaporation.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Palabras clave.....	2
4. Keywords.....	2
índice .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5. Introducción .....	5
5.1. Problemática ambiental.....	5
5.2. Ectoína: ¿qué es y cuáles son sus aplicaciones?.....	6
5.3. Producción de ectoína.....	7
5.4. Purificación de la ectoína.....	9
5.5. Proyectos activos implicados en la producción y purificación de ectoína..	11
6. Objetivos.....	13
7. Trabajo experimental.....	15
7.1. Estudio experimental bio-milking.....	15
7.1.1. Materiales y métodos.....	15
7.1.2. Equipos.....	15
7.1.3. Técnicas análiiticas.....	15
7.1.4. Procedimiento experimental.....	16
7.2. Estudio experimental electrodiálisis.....	20
7.2.1. Materiales y métodos.....	20
7.2.2. Equipos.....	20
7.2.3. Técnicas analíticas.....	20
7.2.4. Procedimiento experimental:.....	21
7.3. Estudio experimental de la columna de intercambio iónico.....	24
7.3.1. Materiales y métodos.....	24
7.3.2. Equipos.....	24
7.3.3. Técnicas analíticas.....	24
7.3.4. Procedimiento experimental.....	25
7.4. Estudio experimental de la precipitación con metanol.....	27
7.4.1. Materiales y métodos.....	27
7.4.2. Equipos.....	27

7.4.3. Procedimiento experimental.....	27
7.5. Estudio experimental de la cristalización.....	29
7.5.1. Materiles y métodos.....	29
7.5.2. Equipos.....	29
7.5.3. Procedimiento experimental.....	29
8. Resumen resultados experimentales. ....	31
9. Cálculo y dimensionado de una planta de purificación.....	35
9.1. Diseño de la planta.....	35
9.1.1. Bases de diseño del proceso.....	35
9.1.2. Descripción del proceso.....	36
9.1.3. Diseño de equipos.....	38
10. Estudio de la viabilidad económica del proyecto. ....	43
10.1. Costes de capital.....	43
10.2. Análisis de sensibilidad.....	43
11. Análisis ambiental de la planta. ....	49
12. Conclusiones y líneas futuras.....	51
13. Bibliografía.....	53
14. Anexos.....	57
14.1. Anexo 1: planos.....	57
14.2. Anexo 2: cálculos.....	60
14.2.1. Columna de intercambio iónico.....	60
14.2.2. Bomba de impulsión.....	63
14.2.3. Tanque de almacenamiento .....	66
14.3. Anexo 3: balance de materia.....	67

## 5. INTRODUCCIÓN

### 5.1. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL.

El metano es el segundo gas de efecto invernadero (GEI) más importante, representando el 20% del total de GEIs. Éste posee un potencial de calentamiento global 25 veces mayor que el CO<sub>2</sub> y su concentración atmosférica aumenta cada año entre un 0,2 y 1 %, provocado principalmente por actividades humanas.(Cantera et al., 2016; López et al., 2013)

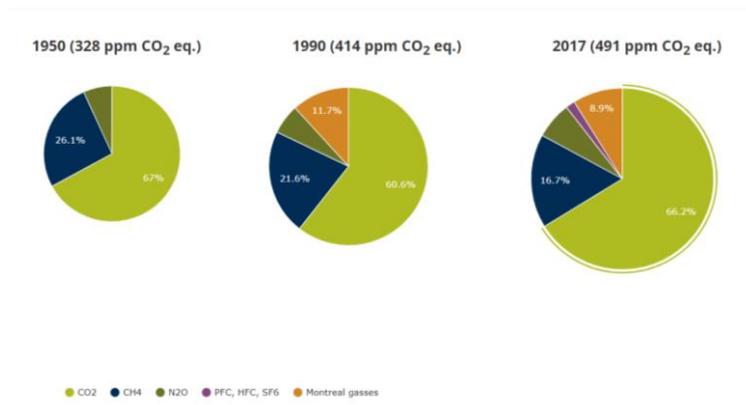


Figura 1. Contribución de los diferentes GEI prevista por el protocolo de Kyoto y Montreal de la concentración global de GEI en 2012 y su evolución prevista (EEA, n.d.).

El metano se produce en la digestión anaerobia, su concentración atmosférica haya alcanzado niveles hasta un 150% superiores a los de la era pre-industrial, siendo un 60 % de las emisiones causadas por la actividad humana. Las principales fuentes antropogénicas son: zonas de extracción y transporte de gas natural (33%), la fermentación entérica (granjas de rumiantes) (22%), gestión de residuos (20%), minas de carbón (9%), gestión de estiércol (8%) y otros (6%).(Hanson & Hanson, 1996; Intergovernmental Panel on Climate Change, n.d.)

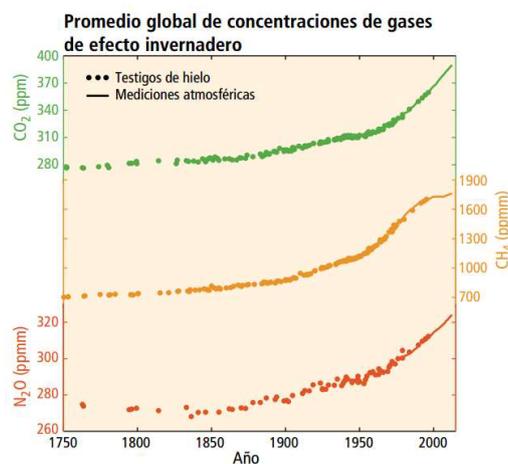


Figura 2. Cambios en las concentraciones de los GEIs a lo largo de los años.(Delgado et al., n.d.)

El metano tiene un gran interés como combustible en la producción de energía. Para ello se requieren concentraciones de este gas superiores al 30% en volumen en la

emisión gaseosa. Este tipo de emisiones sólo se dan en determinados escenarios, como grandes vertederos o plantas de tratamiento de agua residuales.(Cantera et al., 2017a; Estrada et al., 2014). Concentraciones de metano inferiores son considerados residuos que es necesario tratar y valorizar.

Debido a los crecientes daños que genera el metano, se han desarrollado diferentes estrategias políticas y sociales para combatir su emisión. En este contexto, los miembros de las Naciones Unidas se han comprometido a reducir las emisiones de los GEIs con el objetivo de mantener la temperatura media global 2° C por encima de los niveles preindustriales, resultando, por tanto, fundamental la reducción de la llegada de estos gases a la atmósfera. Una alternativa de valorización de estas emisiones es la producción de ectoína, que aprovecha el metano como fuente de alimentación de las bacterias productoras, evitando su emisión a la atmósfera.(Cantera et al., 2017a; Intergovernmental Panel on Climate Change, n.d.)

## 5.2. ECTOÍNA: ¿QUÉ ES Y CUÁLES SON SUS APLICACIONES?

La ectoína, un compuesto cíclico derivado del aspartato (ácido 2-metil-3,4,5,6-tetra-4-pirimidinocarboxílico), es uno de los productos más rentables producidos por microorganismos, con un valor aproximado de 1000-1300 US\$/kg (Strong et al., 2015, 2016).

Así, la ectoína, extremolito y osmoprotector, que fue detectada por primera vez en la bacteria Halorhodospira halochloris, es el compuesto más importante de los producidos en base a CH<sub>4</sub>. (Carmona-Martínez et al., 2021).

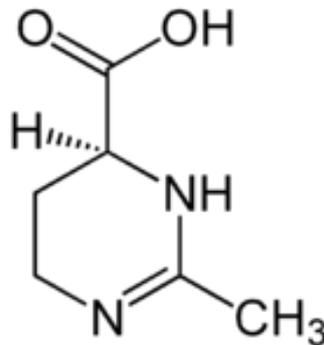


Figura 3. Estructura química de la ectoína.(Ectoína - Wikipedia, La Enciclopedia Libre, n.d.)

Las bacterias que habitan medios con un alto contenido salino han desarrollado la capacidad de generar compuestos que les ayuden a soportar el estrés osmótico, además de otros aspectos como pueden ser los cambios de temperatura, la desecación, la radiación... y otros agentes desnaturalizantes. Entre ellos destaca la ectoína, siendo uno de los compuestos más interesantes debido a sus propiedades. Las bacterias producen ectoína para protegerse del estrés salino, proporcionando un equilibrio osmótico sin intervenir en sus funciones vitales ni en el metabolismo celular; a su vez protege a las células de otros tipos de estrés. Además, este compuesto es capaz de estabilizar enzimas y tiene un papel importante en el

plegamiento y la agregación de proteínas y péptidos. Se han realizados otros descubrimientos notables acerca de este compuesto como, por ejemplo, que la ectoína inhibe la agregación y neurotoxicidad de un péptido que desencadena enfermedades priónicas.

Dentro de los mecanismos de acción protectora de este compuesto, cabe destacar la formación de una cáscara de hidratación alrededor de macromoléculas, como ADN y proteínas. En este grupo de macromoléculas también se encuentran los lípidos, igualmente protegidos por la ectoína, la cual mantiene y estabiliza la organización de las bicapas lipídicas (Orhan et al., 2023a).

Centrándonos en el ámbito comercial, la ectoína presenta aplicaciones principalmente en cosmética, debido a que protege las células humanas de alérgenos, calor, sequedad y luz UV. Además, ha sido utilizado en el sector farmacéutico como compuesto para productos de inhalación y sprays nasales (Carmona-Martínez et al., 2021). Profundizando en su papel dentro de la cosmética, la ectoína mejora la hidratación de la piel, ya que evita la pérdida de agua por parte de las células de la epidermis, además de mejorar su barrera protectora, protegiéndola frente a factores externos, como la luz UV. mencionada anteriormente, y todo ello sin producir alergias ni irritaciones. Dentro del campo de la medicina se ha descubierto otras potenciales aplicaciones de la ectoína, siendo utilizada en terapias antiamiloides para tratar la enfermedad de Alzheimer, inhibiendo la formación del amiloide A $\beta$ 42, y reduciendo la toxicidad de las células del neuroblastoma humano. Además, se ha demostrado que la administración de ectoína inhibe la actividad de nanopartículas responsables de reacciones inflamatorias en las células epiteliales pulmonares. Todo esto son solo algunos ejemplos de las aplicaciones de la ectoína en las diferentes industrias (Pastor et al., 2010).



Figura 4. Medicamento con ectoína. (Hylo Intense Colirio Lubricante Con Ectoína - 10 ML. 300 Gotas, n.d.)

### 5.3. PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA.

Dada la importancia del metano como gas de efecto invernadero, y el alto valor añadido y aplicaciones de la ectoína, una de las principales alternativas de valorización de este gas es usarlo como fuente de alimentación para bacterias

capaces de producir ectoína. Actualmente, la ectoína solo se produce a escala industrial a partir de cultivos de las bacterias metanótrofas de la cepa  $\gamma$ -*Proteobacteria Halomonas elongata*, siendo ésta capaz de ser reutilizada hasta nueve veces por cultivo para la producción de ectoína, presentando alta tolerancia a la sal y sintetizando el compuesto de manera eficaz. Estudios recientes aceptan la posibilidad de utilizar cultivos de *M. alcaliphilum* 20Z para lograr el mismo objetivo.

El proceso de obtención de la ectoína a partir de estas bacterias, denominado *bio-milking*, consiste en una fermentación *long-fed batch* variando las concentraciones de NaCl. Inicialmente, la bacteria *H. elongata* se cultiva en un medio de baja salinidad con el fin de obtener cultivos de alta densidad. A continuación, se llevan a un medio de alta salinidad que favorece la producción de ectoína, generada por las bacterias para protegerse del estrés salino, como se ha comentado en el primer apartado. Finalmente, se exponen los cultivos a un shock hiposmótico para inducir la liberación de ectoína, que posteriormente será purificada.(Cantera et al., 2017b).

Debido al aprovechamiento de emisiones de metano de baja concentración como alimentación de las bacterias, este proceso se ha convertido en una alternativa muy atractiva para la producción de ectoína. Es necesario tratar este gas para suministrárselo a las bacterias, mediante una desulfuración previa, comenzando con una etapa de eliminación del sulfuro de hidrógeno  $H_2S$ , previniendo así la formación de  $H_2SO_4$  en presencia de agua y el daño en el biorreactor y en el equipo de purificación. Se ha determinado que la mejor manera de llevar a cabo este proceso es mediante un filtro anóxico de biotrickling, ya que consigue la mayor eficacia de eliminación (Pérez et al., 2021).

Según varios estudios, las poblaciones de un solo tipo de bacteria son menos robustas y acumulan menor cantidad de ectoína que otras poblaciones conformadas por un conjunto de especies. Además, las condiciones del medio, como el pH, la temperatura, los nutrientes o la salinidad, también afectan a la generación de ectoína, al igual que la presencia de tungsteno en el medio, que evita la acumulación de ácido fórmico, el cual inhibe la producción del compuesto deseado (Carmona-Martínez et al., 2021).

Los estudios han determinado que la concentración de ectoína es de 12-16 mg/100 mg de biomasa utilizando un medio con una concentración salina de 6% NaCl, obteniendo entre 1-3 g de biomasa/ 1 L de medio (Rodero et al., 2022).

Por último, dentro del marco de la Universidad de Valladolid, en el Instituto de procesos Sostenibles, se vienen realizando estudios acerca de la producción de ectoína a partir de metano. Se trabaja actualmente en el laboratorio con un reactor aislado de columna de burbujeo con un volumen de 20 L y una concentración salina en el medio de 6% NaCl. Este reactor y su producción se han comparado con otra instalación, constituida por dos biorreactores interconectados, ambos con un volumen de 10 L, uno con una concentración de 0% NaCl y el otro con un 6% NaCl.

En dicha investigación se realizaron estudios preliminares de bio-milking, obteniéndose buenos resultados al aplicar una centrifugación inicial al cultivo del reactor a 10000 rpm durante 5 min, para, a continuación, trabajar con la biomasa centrifugada; mezclándola con agua destilada en una ratio 1.5 L agua destilada/4 L caldo de cultivo durante 5 min para favorecer la liberación de ectoína. Seguidamente se vuelve a centrifugar a 10000 rpm durante 5 min, para separar la biomasa del sobrenadante que contiene ectoína. Este último producto es con lo que se trabajaría en posteriores etapas de purificación. De este proceso se llegaron a obtener 87 mg ectoína/ g VSS en el biorreactor con 6% NaCl y 52 mg ectoína/ g VSS en el biorreactor de 0% NaCl.



*Figura 5. Reactor de Flujo de Taylor para producción de ectoína empleado en el laboratorio del Instituto de Procesos Sostenibles.*

#### 5.4. PURIFICACIÓN DE LA ECTOÍNA.

La purificación de la ectoína es una etapa muy importante para la producción comercial de la misma, ya que las aplicaciones farmacéuticas y cosméticas requieren una elevada pureza. Debido a ello se investiga para hallar un proceso viable, tanto de manera técnica como económica, que facilite esta purificación.

Comenzaremos comentando el proceso de purificación que se trata de diseñar y optimizar en este proyecto, basado en el paso por una columna de intercambio iónico seguido de una cristalización con metanol.

De acuerdo con la bibliografía disponible, el proceso más viable actualmente para lograr esta purificación de la ectoína consta de varias etapas. En primer lugar, una vez realizado el bio-milking y una posterior centrifugación para separar la biomasa

de la disolución con ectoína, se realiza una electrodiálisis para desalinizar dicha disolución. En el segundo paso, la corriente líquida es acidificada hasta pH 2 mediante la adición de una disolución 1.5 M de HCl con el fin de ionizar la ectoína. A continuación, extraemos la ectoína de la disolución empleando una columna de intercambio iónico, de la que se eluye con una disolución de NaOH 1.3 M; se han observado diferentes eficiencias de recuperación en función de las resinas utilizadas. Estudios previos ya habían identificado la importancia de este factor en esta etapa, proporcionando costes entre 291.9 y 181.1 €/kg ectoína producida y purificada para eficiencias de recuperación del 45% y del 100%, respectivamente. La selección de resinas altamente activas (gran capacidad de adsorción), compactas (alta densidad) y selectivas es un factor determinante en el precio de la ectoína, ya que influye de forma importante en la cantidad y calidad de ectoína producida, aún cuando se mantienen similares costes fijos, de amortización y operativos.

Seguidamente, la disolución alcalina que contiene la ectoína se neutraliza con  $H_2SO_4$  y se seca por evaporación hasta obtener una concentración del 95% en sólido. En el último paso, la ectoína concentrada se purifica mediante una cristalización con metanol, para lo cual el concentrado de ectoína se solubiliza en metanol, en un reactor continuo de tanque agitado durante 1 hora, añadiéndose los compuestos en una relación de 10 kg metanol/kg ectoína. El metanol precipita el sulfato de sodio, presente debido a la adición de NaOH y  $H_2SO_4$ . Una vez filtrada la disolución, la ectoína se recupera por cristalización evaporativa.

Para recuperar el 90 % del metanol empleado se someterá la disolución a un ciclo de evaporación-condensación que utiliza vapor a baja presión (2 bar) y agua de refrigeración (15 °C). El producto final, la ectoína, se obtiene, por fin, tras eliminar el metanol restante mediante un posterior secado en bandeja con aire (Pérez et al., 2022).

Además de este método, que es el que utilizaremos en nuestro proyecto, existen varias alternativas.

Por ejemplo, la ectoína puede ser purificada empleando métodos cromatográficos. Estos métodos son simples y prácticos, sin embargo, pueden presentar desventajas debido a su elevado coste. (Orhan et al., 2023b)

Otra alternativa en investigación es la extracción con sistemas acuosos bifásicos (ABS). Esta técnica consiste en el empleo de dos fases líquidas inmiscibles para recuperar un biomaterial, como pueden ser proteínas, anticuerpos u orgánulos celulares. En torno al 80-95% del contenido del ABS es agua, que proporciona un entorno biocompatible para el procesamiento de estas biomoléculas, conservando su conformación nativa. Además, la baja tensión interfacial del ABS hace que sea un sistema de operación sencillo, añadiendo esto a la facilidad para ser implementado a escala laboratorio con elevados rendimientos y productividad. En este tipo de métodos también entra en juego un líquido iónico, que se usa para recuperar la ectoína intracelular de las bacterias. Este tipo de procesos está aún en fase de

desarrollo, estudiándose la influencia de diferentes parámetros, como el tipo de sal utilizada o el pH, para ver cómo afectan al porcentaje de ectoína recuperada (Ng et al., 2020).

#### 5.5. PROYECTOS ACTIVOS IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ECTOÍNA.

Este trabajo se encuadra dentro de dos proyectos europeos actualmente activos en los que participa el Instituto de Procesos Sostenibles. En ambos proyectos se propone la valorización de corrientes de metano residuales y/o de biogás para la producción de ectoína y se estudia la extracción y recuperación de este producto.

##### CHEERS

Proyecto en el que participan varias empresas, desde las españolas Mahou o Aqualia, entre muchas otras, hasta algunas extranjeras, como pueden ser la empresa holandesa Entogourmet B.V. o la empresa suiza Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, todas ellas en colaboración con la UVa.

El objetivo de este proyecto es ofrecer una solución para el tratamiento de la gran cantidad de residuos generados por la industria alimentaria y de la bebida, ya que en Europa se producen anualmente 30 Mton de residuos y 94 Mton de CO<sub>2</sub> provenientes de este sector.

En el caso de la industria cervecera se generan grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> debido al ingente volumen de cerveza que produce: 405 millones de hL anuales; generando 3.5 kg CO<sub>2</sub> y 0.7 kg CH<sub>4</sub> de residuos por cada hL de cerveza.

Por ello, el objetivo principal del CHEERS es contribuir a disminuir el impacto ambiental y aumentar la eficiencia de los recursos de las empresas de bioprocesos, demostrando que algunos residuos que no se aprovechan pueden biotransformarse en productos con aplicaciones a nivel industrial.

Aquí es donde entra la UVa, que tratará de obtener ectoína a partir de los residuos de las plantas cerveceras, teniendo intención de implantar este sistema de aprovechamiento en la planta de Mahou en Lleida. Para ello, el biogás generado, junto al bioCH<sub>4</sub>, se aprovechará como alimento para bacterias metanótrofas en un biorreactor de flujo de Taylor en condiciones de alta salinidad, de las que se pretende obtener la ectoína. La UVa también participará en la optimización del proceso de bio-milking y de purificación (CHEERS, n.d.; CHEERS: Nuevo Proyecto Europeo de Horizonte Europa Empieza - Innovarum, n.d.).

##### DEEP PURPLE

Este proyecto presenta un objetivo similar al CHEERS, aunque con diferente materia prima. En este caso se propone un tratamiento integrado y sinérgico para el aprovechamiento de tres tipos de residuos: la fracción orgánica de los residuos de sólidos urbanos, los fangos de estaciones depuradoras de aguas residuales y las

aguas residuales urbanas. Este se lleva a cabo en una fotobiorrefinería multiplataforma basada en bacterias púrpuras fototróficas, permitiendo la generación de cinco nuevos bioproductos con aplicación comercial en los sectores de cosmética, plásticos, construcción y fertilizantes.

DEEP PURPLE está coordinado por Aqualia, que además es la empresa responsable del escalado de la tecnología Advansist para el tratamiento de aguas residuales urbanas a bajo coste. Esta tecnología se basa en el uso de bacterias púrpuras fototróficas en carruseles anaerobios con un doble propósito: la depuración de aguas residuales y la generación de una biomasa enriquecida como materia prima para la generación de nuevos bioproductos.

El proyecto DEEP PURPLE contempla la recuperación de celulosa y su posterior aplicación en recubrimientos para fertilizantes y en aditivos de construcción, así como la valorización de biogás en ectoína con aplicación en el sector cosmético, etapa donde entra la UVA para tratar de optimizar el proceso de obtención y purificación (Deep Purple., n.d.).

## 6. OBJETIVOS.

El objetivo de este proyecto es diseñar una planta de demostración de extracción y purificación de ectoína generada en un biorreactor con organismos metanótrofos alimentados con corrientes gaseosas residuales que contienen metano. El tamaño de la planta viene dado por el proyecto europeo en el que se integra, que marca la necesidad de producir 20 kg ectoína/año con una pureza del 95 %, alcanzando un rendimiento de recuperación del 85%. Para lograr este objetivo general, se plantean otros específicos:

- Estudiar, a escala laboratorio, las principales etapas del proceso de extracción y purificación propuesto en la bibliografía
- Diseñar la planta demostración y sus planos.
- Realizar el balance de materia de la planta.
- Elaborar un análisis medioambiental preliminar.
- Elaborar un análisis económico preliminar.



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## 7. TRABAJO EXPERIMENTAL.

### 7.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL BIO-MILKING.

#### 7.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

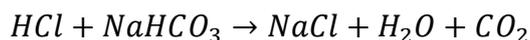
Se utilizaron como métodos una centrifugación y una extracción con agua y como materiales agua destilada y el caldo de cultivo de las bacterias metanótrofas proporcionado por el proyecto Deep Purple.

#### 7.1.2. EQUIPOS.

Se utilizaron una centrifugadora refrigerada de la marca ThermoFisher Scientific modelo Sorvall X4R Pro, con capacidad para tratar 4 muestras de 1 L o 6 muestras de 0.2 L; un equipo de análisis de carbono orgánico total (TOC) de la marca Shimadzu modelo TNM-L ROHS; un cromatógrafo HPLC Polaris 3 NH2 150x4,6 mm, de Agilent, para medir la cantidad de ectoína; una balanza analítica, un agitador, una mufla, un horno y un microscopio.

#### 7.1.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS.

Análisis del carbono orgánico total (TOC) y de carbono inorgánico total, análisis de sólidos volátiles y totales y análisis de ectoína. El carbono orgánico total e inorgánico se analiza mediante un equipo de medición del mismo que lo que hace inicialmente es eliminar de la muestra las fuentes inorgánicas de carbono, que existen en forma de sales de carbonato y bicarbonato y minerales. Esto se hace típicamente tratando la muestra con ácidos no oxidantes como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HCl, liberando CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, como se muestra en la siguiente reacción:



A continuación, la medida del TOC se realiza a través de la combustión completa de la muestra en una atmósfera libre de carbono (típicamente una atmósfera de oxígeno puro). La cuantificación de la muestra se realiza a través de una celda de detección infrarroja no dispersiva. Se puede observar un estiramiento asimétrico característico a 2350 cm<sup>-1</sup> para CO<sub>2</sub>. La intensidad de esta señal infrarroja CO<sub>2</sub> es proporcional a la cantidad de CO<sub>2</sub> la muestra, midiendo así la cantidad de carbono.

El análisis de sólidos totales (ST) y volátiles (SV) se realiza dentro del laboratorio por parte de un técnico. El proceso, consiste en la introducción de la muestra una vez pesada en el horno a 105 °C durante el tiempo necesario para la evaporación de todos los líquidos presentes en la misma. A continuación, la muestra se pesa para medir los sólidos totales y se lleva a la mufla a 550 °C para conseguir quedarnos solo con aquellos sólidos no volátiles, se pesan y la diferencia con los ST son los SV.

Por último, el análisis de la cantidad de ectoína se realiza mediante HPLC, consistente en una columna cromatográfica Polaris 3 NH2 150x4,6 mm, de Agilent, que retiene la ectoína un tiempo de 11.6 s hasta que llega al detector de absorción

en el ultravioleta visible en la columna cromatográfica, que nos da la cantidad del compuesto de interés en ppm.

La extracción completa de la ectoína de la biomasa se realiza mediante un procedimiento de laboratorio que consiste en centrifugar dos mL del caldo de cultivo con la biomasa a 9000 G durante 10 min para después desechar el sobrenadante. A continuación, se agrega al tubo donde se encuentra la biomasa centrifugada una disolución de 6% NaCl en agua tipo 1, para luego resuspender la biomasa utilizando un vortex, centrifugar nuevamente a 9000 G durante 10 min, desechar el sobrenadante y repetir con el objetivo de lavar la biomasa. Seguidamente se pasa a la extracción de ectoína, agregando 1.8 mL de etanol al 70% a la biomasa, para resuspender otra vez, añadir 25-30 mg de zirconia y ya llevar esta mezcla al Minbead-beater por 10 min con el objetivo de romper las células. Una vez rotas las células y ya liberada la ectoína, se vuelve a centrifugar, desechando en este caso la biomasa y llevando el sobrenadante al HPLC para el análisis de ectoína.

#### 7.1.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El primer paso realizado a nivel de laboratorio fue estudiar la etapa de extracción con agua. El uso de volúmenes reducidos para biomilking disminuye el tamaño y costes de operación de los equipos necesarios. Además, el trabajo con disoluciones concentradas aumenta el rendimiento de eliminación de sales en la electrodiálisis.

Para esta optimización se han desarrollado varias pruebas. La primera que se llevo a cabo fue la recuperación de la biomasa del caldo de cultivo. Para ello se realizaron dos centrifugaciones:

- ➔ Una centrifugación inicial de 1 L de caldo de cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos.
- ➔ El sólido de este primer centrifugado se resuspende en únicamente 250 mL de sobrenadante de la primera centrifugación para poder trabajar en la centrífuga a mayor velocidad. Se emplea medio y no agua para la resuspensión con el objetivo de evitar la liberación de la ectoína debido a un shock hiposmótico durante el centrifugado. Se realiza una segunda centrifugación a 10000 rpm durante dos minutos para acabar de concentrar la biomasa.

El objetivo principal de la centrifugación es, aparte de recuperar la biomasa, eliminar la mayor cantidad de sal posible que se encuentra en el caldo de cultivo y, como consecuencia, en la biomasa. La sal retenida en la biomasa se va a liberar durante el bio-milking, por lo que cuanto más centrifugue, menos sal pasará a las etapas posteriores, ya que la biomasa liberará más medio salino de cultivo, y, por lo tanto, se reducirá el gasto en la etapa de electrodiálisis.

Al analizar las fases líquidas de la centrifugación, se observó un aumento de la concentración de sólidos volátiles en la fase líquida durante el segundo centrifugado, lo que podría indicar pérdida de ectoína en esta segunda etapa. Ante esta posible perdida, se realizaron análisis de ectoína de este segundo sobrenadante en el HPLC

para comprobarla, obteniendo la no presencia de ectoína (Tabla 1). Por lo tanto, se decidió seguir trabajando con este método de doble centrifugación en la posterior experimentación.

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	[Ectoína] (ppm)	TOC (mg/L)
Líquido inicial	78.37	6.82	0	41.41
1er sobrenadante	76.53	4.99	0	-
2º sobrenadante	137.44	66.55	0	16.93

Tabla 1. Propiedades de los sobrenadantes y el líquido inicial

Una vez obtenida la biomasa húmeda se realizó un análisis de la cantidad de ectoína que esta presentaba y la cantidad real de biomasa seca presente en esta biomasa húmeda tras el doble centrifugado, obteniendo los siguientes resultados:

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	mg ectoína obtenida/g biomasa seca
Biomasa húmeda	107.09	38.4	13.3

Tabla 2. Análisis realizados sobre la biomasa con la que se trabajó.

A continuación, se pasó a las pruebas de extracción. Para ello se vertieron diferentes volúmenes de agua destilada en diferentes muestras de biomasa húmeda, de aproximadamente 2 gramos.

Uno de los problemas que se podía presentar en estas pruebas era que el exceso de agua supusiese un shock hiposmótico demasiado fuerte sobre las bacterias, provocando su ruptura y muerte, lo que no interesa porque se desea devolverlas al biorreactor. Por ello se hicieron dos pruebas para cada volumen, una añadiendo todo el volumen en una sola adición, y otra añadiéndolo de manera gradual, vertiendo el volumen en 4 adiciones cada 3 minutos, para observar si de esta forma se lograba que las bacterias se fueran aclimatando al medio sin que el shock fuese muy agresivo. Tras los análisis no se encontraron diferencias remarcables entre los resultados de ambos procedimientos.

A continuación, se vuelven a centrifugar todas las muestras para separar todo el sobrenadante, donde se supone que está la ectoína de la biomasa que ha sido liberada, de las bacterias que se devolverán al biorreactor.

Una vez centrifugado se llevaron las muestras a analizar sólidos volátiles/sólidos totales, carbono orgánico total y ectoína.

Además, la biomasa de las diferentes muestras se llevó al microscopio para ver si las bacterias siguen vivas.

En el análisis microscópico no se apreció apenas diferencia en la actividad de las bacterias y el número de ellas que permanecían vivas, por lo que, a priori, no afecta la cantidad de agua añadida ni la forma de hacerlo.

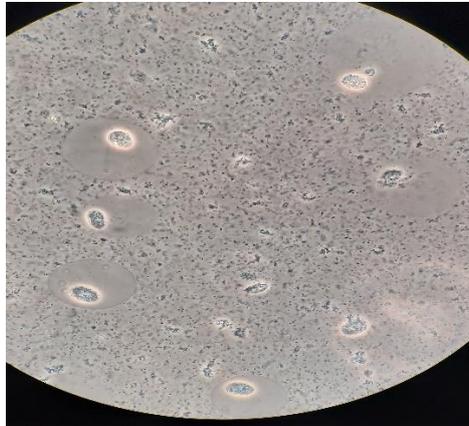


Figura 6. Bacterias vistas a través del microscopio.

En el análisis de TOC, se obtuvieron los siguientes resultados:

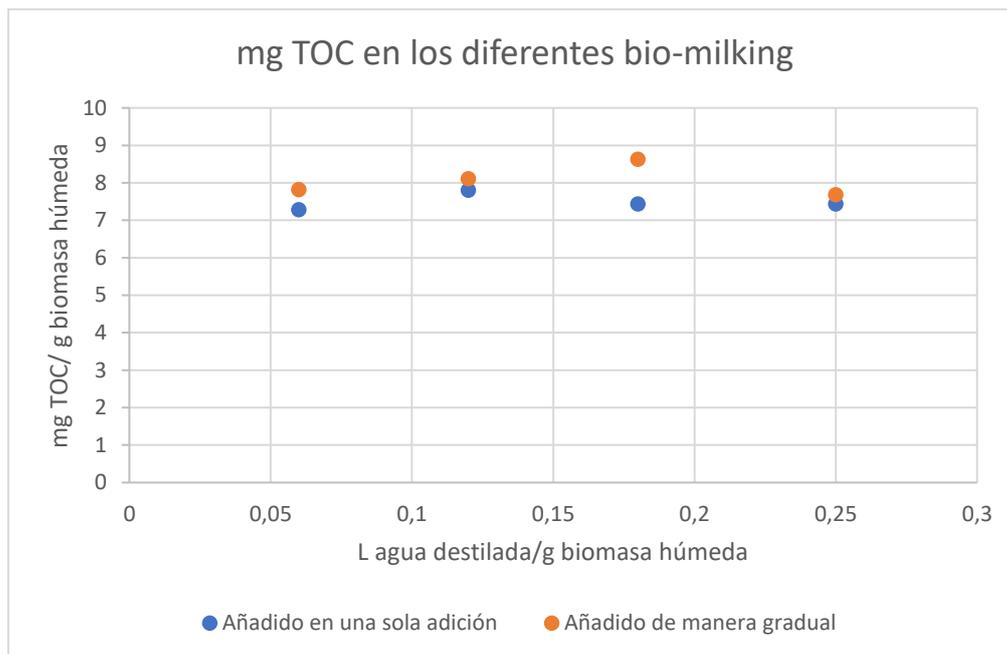


Figura 7. Resultados del primer análisis TOC de extracciones con diferentes cantidades de agua.

Como se puede observar, todas las muestras tienen un nivel similar de mg de carbono por g de biomasa. Estos resultados, parecen indicar que la cantidad de ectoína liberada no cambiaría con la cantidad de agua, por lo cual se probó a trabajar con menor cantidad para reducir el coste posterior de evaporación.

De esta forma, se realizó la extracción con 0.02 L y 0.06 L de agua destilada por gramo de biomasa húmeda, añadidos tanto de manera gradual como de golpe, y se llevaron al análisis TOC, además de repetir el análisis de la muestra de 0.5 L añadido

de manera gradual, que corroborará si el resultado previo es correcto. Los resultados del segundo análisis TOC fueron los siguientes:

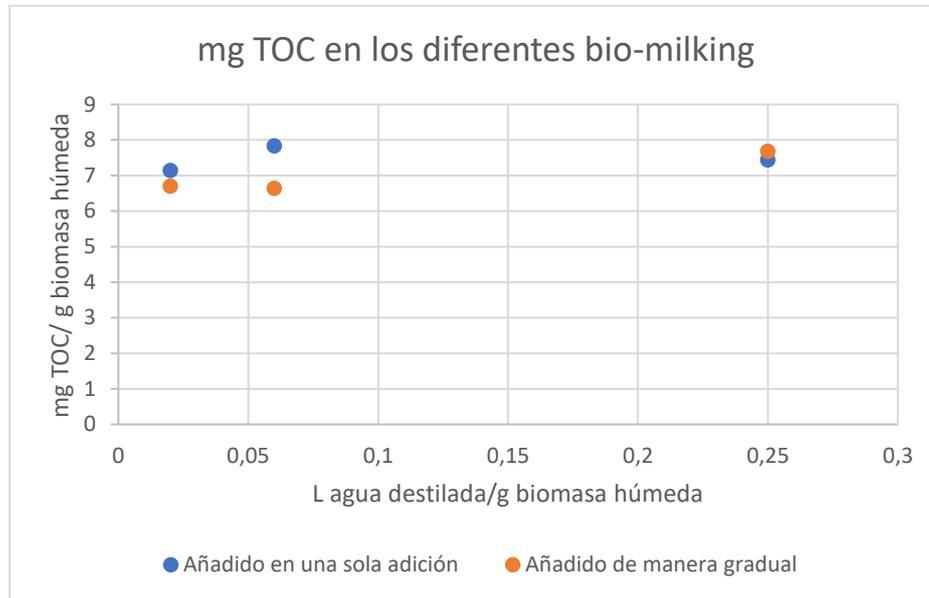


Figura 8. Resultados del segundo análisis TOC de extracciones con diferentes cantidades de agua.

La cantidad de sólidos volátiles y sólidos totales liberados por gramo de biomasa húmeda son similares, aunque en ligero aumento, para volúmenes de agua añadidos mayores de 0.01L/g. La extracción resultó mucho menor para 0.01L/g y 0.02 L/g de agua (Figura 9).

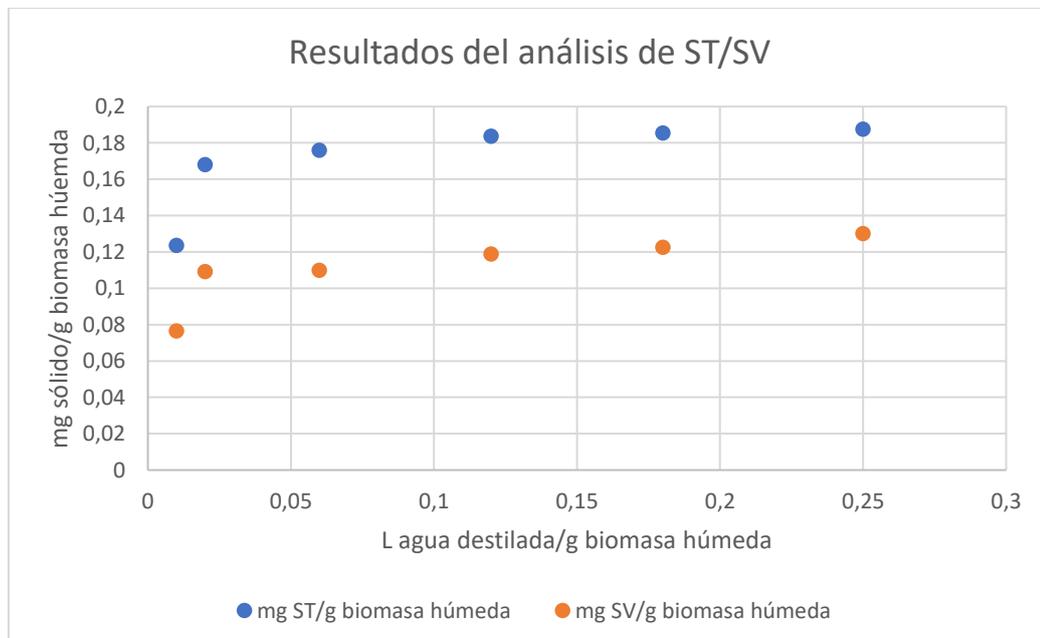


Figura 9. Resultados de los análisis de ST y SV en los diferentes bio-milking realizados.

Tal y como ocurrió con el contenido en sólidos totales y sólidos volátiles, los resultados de los análisis de ectoína fueron muy diferentes:

Muestra	mg ectoína extraídos/g biomasa seca	[Ectoína] (ppm)	% Ectoína extraído respecto a lo contenido en la biomasa
0.02 L agua destilada/g biomasa húmeda	0.4857	2.601	3.92 %
0.25 L agua destilada/g biomasa húmeda	13.2996	5.697	100%

Tabla 3. Resultados concentración de ectoína en las muestras tras su extracción.

Como se puede observar en base a los resultados obtenidos, la extracción con 0,25 L agua destilada por g biomasa húmeda consigue un rendimiento de extracción del 100%, mientras que a volúmenes bajos de agua añadida la liberación es muy deficiente. Se decide trabajar con 0.25 L de agua destilada/g de biomasa húmeda.

En el desarrollo de este estudio no fue posible determinar el rendimiento de extracción de ectoína para los volúmenes intermedios de agua añadidos, debido a problemas en el equipo de análisis de ectoína. Futuros trabajos en este campo incluirán el estudio de rendimientos de extracción de ectoína en el rango de 0.06 a 0.25 L de agua añadida por gramo de biomasa húmeda, para tratar de reducir al mínimo posible la adición de agua.

## 7.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL ELECTRODIÁLISIS.

### 7.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Una centrifugación para separar la biomasa, una vez que ha liberado la ectoína y un equipo de electrodiálisis de la marca Guochu Technology modelo GCM-E-10 para eliminar el NaCl de la disolución de ectoína.

Como materiales se han utilizado agua destilada para preparar la disolución desalinizadora y agua destilada con NaOH con una concentración 2 M como disolución polar para ser utilizadas en la electrodiálisis.

### 7.2.2. EQUIPOS.

La centrífuga para separar la biomasa que ya ha cumplido su función, la máquina de electrodiálisis para desalinizar la muestra y un conductímetro para medir de manera continua la conductividad de nuestra disolución, ya que, con la eliminación de NaCl de nuestras muestras, la conductividad descenderá de manera proporcional con el avance de la electrodiálisis.

### 7.2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

La medida de la variación de la conductividad y, con ello, de NaCl. La medida de la variación de la conductividad se realiza mediante un conductímetro, como ya se ha comentado, el cual basa su funcionamiento en la aplicación de un campo eléctrico entre dos electrodos, de los cuáles uno se introduce en la disolución que se quiere medir, y una vez aplicado mide la resistencia eléctrica de dicha disolución,

convirtiendo esta medida en S/cm, indicando este valor la cantidad de sólidos disueltos que pueden atravesar la fibra de vidrio.

#### 7.2.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

La electrodiálisis consiste en el movimiento de iones a través de una membrana semipermeable, impulsado por una diferencia de potencial eléctrico. Las membranas utilizadas tienen la propiedad de ser intercambiadores iónicos para los cationes o para los aniones. Las primeras dejan pasar los cationes y repelen los aniones, mientras que en las de intercambio aniónico es al revés.

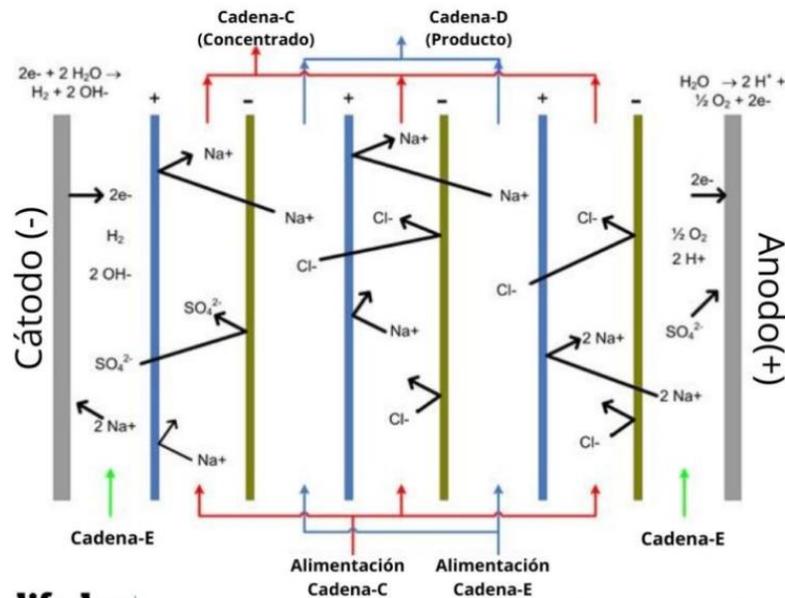


Figura 10. Funcionamiento esquemático de la electrodiálisis.(Condorchem Envitech, n.d.)

Para estudiar el funcionamiento de la electrodiálisis, se realizaron ensayos con dos muestras de biomilking, una con adición de baja cantidad de agua (0.02 L/g de biomasa, y otra con alta (0.25 L/g de biomasa). En primer lugar, se centrifugaron las muestras para separar la biomasa que ya había liberado la ectoína de la disolución con dicha ectoína. Para llevar a cabo la electrodiálisis se requiere un volumen a desalinizar de en torno a 500 mL.

Así se podrá realizar la electrodiálisis, utilizando la máquina que se muestra en la [Figura 12](#) conectando a cada una de las parejas de conductos una disolución de las preparadas, o la disolución de ectoína que se desee desalinizar, o el agua destilada que recibirá la sal o la disolución polar.

Se medirá, además, la conductividad de manera continua de la disolución de ectoína, ya que a medida que disminuya la concentración de NaCl disminuirá la conductividad, pudiendo seguir así el avance del proceso. Así, se pudo apreciar que la conductividad disminuía de manera más rápida en los primeros instantes del proceso, haciéndose más lento a medida que avanzaba. A pesar de ello, las conductividades finales de ambas disoluciones son las mismas, por lo que se puede

asumir que las concentraciones finales de NaCl son las mismas en ambas disoluciones:

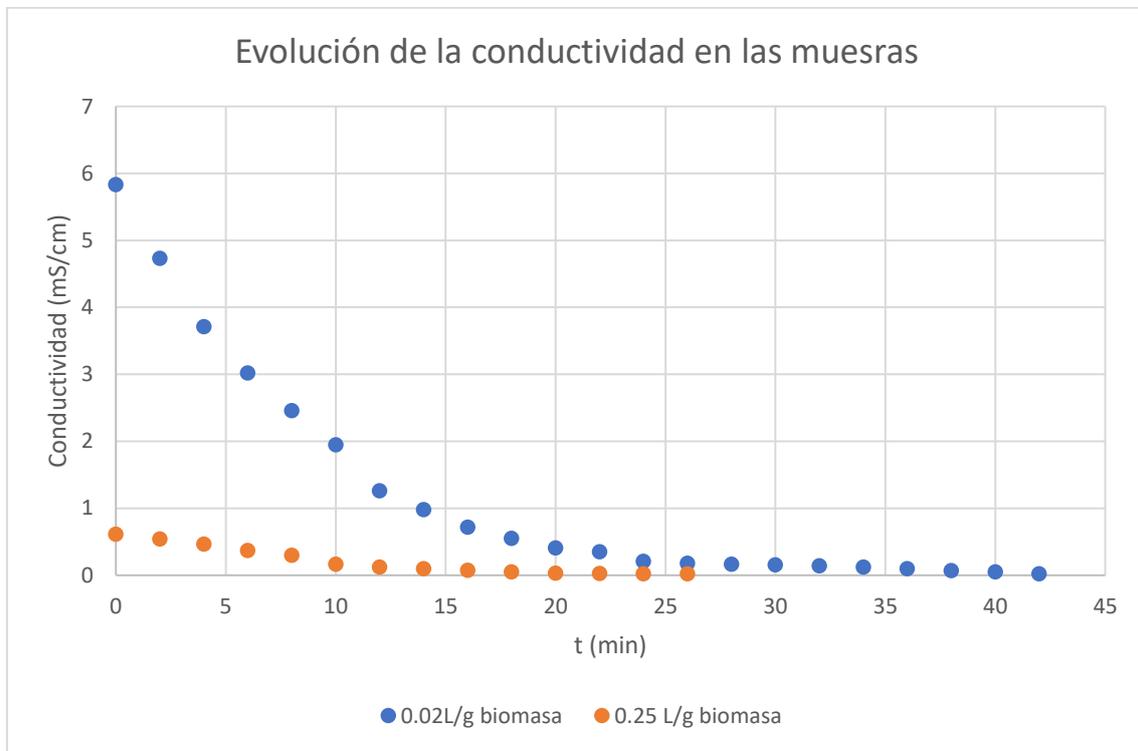


Figura 11. Evolución de la conductividad durante la electrodiálisis.

Con ello obtuvimos los siguientes descensos en la conductividad:

MUESTRA	Conductividad inicial (mS/cm)	Conductividad final ( $\mu$ S/cm)	Tiempo (min)	Flujo (Lpm)
0.02 L/g	5,83	20.17	42	1.6
0.25 L/g	0.614	20.4	26	1.6

Tabla 4. Datos del proceso de electrodiálisis.



Figura 12. Máquina de electrodiálisis.

Tras el paso por la electrodiálisis se volvió a realizar análisis de ectoína, ST y SV de las muestras, obteniendo los siguientes resultados:

Muestra	Volumen de muestra (L)	Ectoína [ppm]	ST (g/kg)	SV (g/kg)	Ectoína [mg]
Bio-milking 0.25 L/g	0.5 L	3.84	0.04	0.08	1.92
Bio-milking 0.02 L/g	0.24 L	3.26	0.38	0.38	0.78

Tabla 5. Cantidad de ectoína en las muestras tras desalinización

Debido a un fallo en el equipo de electrodiálisis se perdió una parte de la muestra del bio-milking de 0.02L/g. Como conclusión, se observa una pérdida del 33% de la ectoína en el caso de bio-milking de 0.25L/g, mientras que en el otro caso se pierde un 40%. Son resultados bastante elevados, por lo que habría que tratar de reducir este porcentaje mejorando las condiciones de operación en el equipo. Probablemente el tiempo de operación ha sido excesivo y se podría haber terminado mucho antes esta etapa. Sin embargo, el objetivo principal de la etapa, que era reducir la cantidad de sal, se ha logrado, ya que el total de sólidos presentes en la disolución son SV, lo que indica la ausencia de NaCl en ambas disoluciones, mientras que antes de pasar por el equipo, la relación de SV/ST era del 35% en el caso del bio-milking 0.25 L/g biomasa y de un 15% en el otro. Respecto a los volátiles, se perdieron alrededor del 33% en ambas muestras, lo que es un porcentaje similar al de la ectoína, por lo que se puede concluir que es un resultado aceptable y que el objetivo de la etapa se ha logrado.

### 7.3. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

#### 7.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para esta etapa de proceso fue necesario montar un dispositivo experimental nuevo en el laboratorio. Teniendo en cuenta la información recibida de otros miembros de uno de los proyectos en los que se enmarca este trabajo, se seleccionó la resina de intercambio iónico comercial DOWEX 50w X8. Esta resina tiene un diámetro de partícula muy pequeño (200-400 mesh, 35-75 micras). Tras unas pruebas preliminares, considerando la hidrodinámica, y los valores habituales de operación en este tipo de columnas, se decidió utilizar dos columnas de adsorción operando en serie, con un diámetro de 3 cm y una altura total de 42 cm (21 cm cada lecho), lo que equivale a 0.205 kg de resina utilizados en un volumen de lecho de aproximadamente 0.3 L. Antes de pasar por la columna, se acidificó la disolución de ectoína procedente de la electrodiálisis con HCl 1.5 M hasta alcanzar un pH de 1.5 con el objetivo de ionizar la ectoína. Las columnas de intercambio iónico basan su funcionamiento en el intercambio del ion de su grupo funcional por el ion presente en la disolución, el cual se desea eliminar, en nuestro caso la ectoína. En función del tipo de ion que se desee eliminar, se empleará un tipo de resina u otro. En nuestro caso es una resina ácida, que recoge la ectoína, que gana un  $H^+$  al ser llevada a un pH de 1.5, lo que la hace unirse a la resina. La velocidad de paso de nuestra disolución por la columna es 0.025 L/min, lo que supone una velocidad en la columna de 0.06 cm/s, bastante inferior a los valores standard de este tipo de lecho. Esta baja velocidad viene motivada por el pequeño diámetro de partícula de la resina empleada.

Una vez adsorbida, para recuperar la ectoína, se empleó como eluyente una disolución de NaOH 1.3 M, con un volumen de 1.2 L, lo que equivale a 4 veces el volumen de lecho de la columna, haciéndola circular a la misma velocidad que la disolución de ectoína. La resina se regeneró con una disolución de  $H_2SO_4$  0.25 N tras su uso, utilizando un volumen de 0,5 L que también se hizo circular a 0.025 L/min.

#### 7.3.2. EQUIPOS.

Dos columnas de adsorción y dos bombas peristálticas para impulsar el fluido por la columna, además de tubos que conectaban las columnas, sumado todo esto al pHmetro para controlar el pH de la disolución a la entrada.

#### 7.3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

En esta parte también se ha llevado a cabo análisis de ST y SV, análisis de ectoína, aparte del análisis de metales pesados, que se lleva a cabo mediante espectrofotometría, que consiste en una técnica analítica utilizada para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra, con base en la ley de Lambert-Beer. Se aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo

un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica de cada sustancia química.

#### 7.3.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Lo primero que se hizo fue intentar trabajar con una sola columna, para ello se cargó la columna con la resina de intercambio iónico a utilizar, suspendida en agua. Como ya se ha comentado, la longitud total del lecho es de 42 cm, aproximadamente 21 cm en cada columna, con 3 cm de diámetro, cargando 0.1 kg de resina en cada una de las columnas, la cual tiene una densidad de  $690 \text{ kg/m}^3$ .

Una vez montada la columna, se hizo pasar por ella agua destilada para comprobar su correcto funcionamiento, pero al ser una resina con un tamaño de grano muy pequeño el flujo no era correcto, por lo que se probó a trabajar con dos columnas, reduciendo a la mitad la cantidad de resina por columna, logrando así el correcto funcionamiento del equipo (Figura 13).

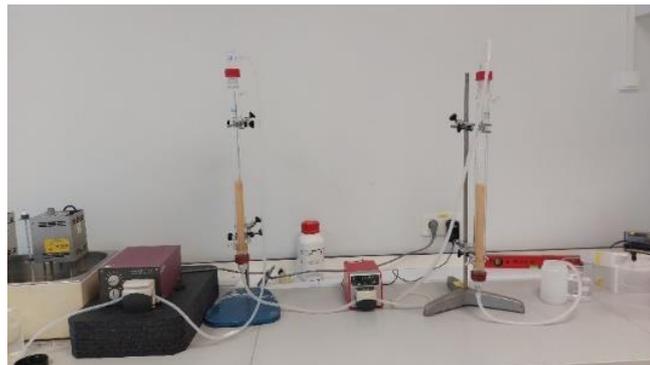


Figura 13. Montaje de las columnas de intercambio iónico en serie.

Una vez montado el equipo, se pasó a la extracción de la ectoína. Para ello se adicionó HCl 1.5 M, hasta alcanzar un pH de 1.5, para lograr ionizar la ectoína. Se presentan aquí únicamente los resultados del biomilking con 0.25L de agua/g de biomasa, debido a la escasa cantidad de ectoína presente en el biomilking con baja cantidad de agua. Fue necesario añadir 20 mL de ácido 1.5 M a la disolución correspondiente al bio-milking de 0.25 L/g de biomasa.

Con la ectoína ya ionizada se inició el paso por la columna de la disolución procedente de electrodiálisis, con una velocidad de paso de 0.025 L/h, como ya se ha comentado. Una vez pasada toda la disolución y, al haber quedado, a priori, la ectoína retenida en la resina se inicia la recuperación de la misma.

La bibliografía (Pérez et al., 2022) indicaba un paso inicial por la columna con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98 % w/w, y a continuación agua destilada, con el objetivo de eluir los metales pesados presentes en la disolución inicial. Sin embargo, el uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado seguido de agua conlleva importantes riesgos de seguridad, un impacto ambiental del proceso y, probablemente podría degradar la ectoína retenida en el lecho. Todo

ello, junto al hecho de que no cabía esperar la presencia de metales pesados en la disolución de ectoína, máxime después de una etapa de electrodiálisis, motivó la eliminación de esta etapa del proceso, comprobando posteriormente la ausencia de metales pesados en la corriente de ectoína.

Para extraer la ectoína de la columna se hizo pasar por ella una disolución de NaOH 1.3 M de volumen cuatro veces el del lecho (1.2 L), con una velocidad de paso de 0.025 L/h. Se analizaron metales pesados (hierro, cobre, zinc, cobalto, níquel y manganeso) en el primer volumen de eluyente, no encontrándose trazas de los mismos, por lo que se descartó su presencia en la columna, ya que deberían haber sido arrastrados por este volumen en caso de estar presentes.

Aunque existían discrepancias en la bibliografía respecto a este punto, para regenerar la columna se emplearon 0.5 L de una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 N a una velocidad de 0.025 L/min (Pérez et al., 2022).

Se realizaron análisis de ectoína para las muestras de la disolución de NaOH 1.3 M una vez que salieron de la columna, obteniendo los siguientes resultados.:

MUESTRA	[Ectoína] (ppm)	mg ectoína
1ª bio-milking 0.25 L/g	0	0
2ª bio-milking 0.25 L/g	0	0
3ª bio-milking 0.25 L/g	2.56	0.77
4ª bio-milking 0.25 L/g	0.88	0.27

Tabla 6. Resultados de la concentración de ectoína con la nueva biomasa en las diferentes fracciones tras el intercambio iónico.

Los resultados parecen indicar que sería necesaria una mayor cantidad de volumen de eluyente, ya que, al tratarse de un lecho fijo, el resultado del paso por la columna debería ser causar la ausencia de ectoína en el último volumen de eluyente, algo que no ocurre, por lo que parte de la ectoína ha podido quedar retenida en la columna. El rendimiento de recuperación de ectoína en esta etapa ha resultado de solo un 54% respecto a la proveniente de la etapa anterior. Es un porcentaje de recuperación bastante bajo, que se podría achacar a varios motivos. Uno es que hubiese quedado ectoína en la disolución inicial, para descartarlo se analizó esta tras su paso por la columna y se vio que no había ectoína. Por tanto, creemos que la causa podría ser la necesidad de utilizar un mayor volumen de disolución de NaOH 1.3 M, ya comentado.

No se dan resultados de sólidos porque se cometió un error en el proceso de análisis, analizando únicamente la muestra de la segunda fracción, que no es representativo, ya que ni siquiera contiene ectoína. En futuros experimentos que habrá que analizarlos para tenerlos monitorizados durante el proceso.

## 7.4. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA PRECIPITACIÓN CON METANOL.

### 7.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la primera parte del proceso, que consistía en acidificar las muestras hasta pH neutro, se utilizó la disolución de NaOH 1.3 M con la que se extrajo la ectoína de la columna, ácido sulfúrico al 98 % w/w para neutralizar nuestra muestra, un pHmetro para controlar el pH de nuestra disolución, una pipeta para ir añadiendo la disolución de ácido sulfúrico y un agitador.

El segundo paso consistió en evaporar una gran cantidad de la disolución que contenía la ectoína, tratando de lograr una concentración en la disolución del 95% en masa de ectoína, para lo que se utilizó un rotavapor con bomba de vacío.

Por último, a la disolución ya concentrada se le añadió metanol (Pérez et al., 2022), Como no se disponía de los datos de la cantidad de ectoína en cada fracción, ya que el método de análisis cromatográfico no estuvo a punto hasta el final de toda esta experimentación, se añadió la misma cantidad de metanol (0.2 L) a todas ellas, formándose así un precipitado de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , que a continuación se filtra utilizando un filtro y una bomba de vacío, obteniendo la disolución de metanol+ectoína sin ningún tipo de sólido.

### 7.4.2. EQUIPOS.

Un pHmetro para ir controlando el pH de la disolución, el agitador para mantener el movimiento durante la medición del pH y mezclar durante la adición de metanol. Para la evaporación se utilizó un rotavapor y una bomba de vacío para la evaporación de la disolución de NaOH. Por último, para la filtración, se utilizó una bomba a vacío, filtros de microfibra de vidrio con un tamaño de poro de 1.5  $\mu\text{m}$  y un soporte para el propio filtro.

### 7.4.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Una vez obtenida la disolución con ectoína de la columna necesitamos neutralizarla. Tras esto se pasó a concentrar por evaporación las disoluciones neutralizadas. Al no disponer de análisis de la cantidad de ectoína, como ya se ha comentado, debido a la no disponibilidad del cromatógrafo HPLC, se decidió reducir el volumen de la disolución de 300 a 10 mL, trabajando a una temperatura de 70 °C y una presión de 0.3 bar, logrando reducir el volumen en 20 min.



Figura 14. Rotavapor utilizado en la fase experimental.

A continuación, se pasó a la precipitación con metanol, para lo cual se añadieron 200 mL del mismo en cada muestra concentrada, logrando precipitar el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , obteniendo solo la disolución con ectoína y metanol tras su filtrado.



Figura 15. Equipo utilizado para el filtrado del precipitado formado tras la adición del metanol.



Figura 16. Precipitado recogido durante el filtrado.

Tras el filtrado se procedió al análisis de ectoína de todos los volúmenes de metanol obtenidos tras el filtrado:

MUESTRA	[Ectoína] (ppm)	mg ectoína
1ª bio-milking 0.25 L/g	0	0
2ª bio-milking 0.25 L/g	0	0
3ª bio-milking 0.25 L/g	2.32	0.46
4ª bio-milking 0.25 L/g	0.64	0.13

*Tabla 7. Resultados de la cantidad de ectoína tras el filtrado de la disolución de metanol.*

El porcentaje de ectoína recuperado respecto a la etapa previa es del 57%, lo que es un resultado bastante deficiente respecto a lo esperado. Por ello, claramente, hay que implementar cambios en esta etapa. Se cometió un error y deberíamos haber analizado el precipitado para ver si se había quedado ectoína retenida en el mismo, al no hacerlo suponemos que es una posibilidad que habría que comprobar en futuros ensayos. Otra posibilidad es que algo de ectoína haya quedado retenida en el filtro, lo que parece poco probable, por lo que habría que estudiar la primera opción. Al igual que en la anterior etapa del paso de la disolución de NaOH por la columna, se prosiguió con el error en el análisis de sólidos, tomando solo el correspondiente a la segunda muestra, por lo que habrá que realizarlo de manera correcta en próximos ensayos.

## 7.5. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CRISTALIZACIÓN.

### 7.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

Como materiales se utilizaron la disolución ya filtrada de metanol y ectoína y agua tipo III que se utiliza como baño en el rotavapor para evaporar el metanol y recuperar la ectoína. Como principio nos basamos en la utilización de una bomba de vacío para disminuir la presión en el interior del rotavapor, logrando así reducir la temperatura de ebullición de nuestra muestra. Con ello logramos evaporar el líquido, en este caso el metanol, y podemos recuperar la ectoína, que queda precipitada en el matraz. Para lograrlo trabajamos a una temperatura de baño de 50 °C y a una presión de 0.56 bar generada por la bomba de vacío.

### 7.5.2. EQUIPOS.

Se utilizó un rotavapor para reducir el volumen de nuestra muestra mediante su evaporación y una bomba de vacío para reducir la presión en nuestro recipiente, logrando así que la temperatura de ebullición fuese menor.

### 7.5.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Una vez filtrada nuestra muestra, se ha obtenido una disolución de ectoína en metanol. Así, para recuperar la ectoína, se evaporará el metanol mediante un rotavapor, logrando obtener por fin la ectoína purificada.



*Figura 17. Ectoína obtenida tras el proceso de purificación.*

Como resultado de esta operación, se pesa el compuesto obtenido tras la evaporación, obteniendo un peso en la muestra obtenida del bio-milking de 0.25L/g de 0.6432 g. Teniendo en cuenta que la cantidad de ectoína presente en la muestra previa a la evaporación era de 0.5906 g, se puede concluir que la pureza de la ectoína obtenida es del 88.72%, no muy lejos del objetivo, pero aún así no es el 95% deseado al principio del experimento, por lo que habría que tratar de aumentar esta pureza mediante la mejora del proceso. Como se ha visto, a la salida de la electrodiálisis se obtenía que todos los sólidos eran volátiles, por lo que las impurezas presentes se han ido recogiendo a lo largo de las siguientes etapas del proceso. Por ello habría que analizar los puntos críticos en los que se puede haber producido, como pueden ser el paso por la columna o la precipitación con metanol, ya que se puede haber arrastrado algún compuesto presente en la columna, o en el caso de la precipitación con metanol se puede no haber añadido la cantidad adecuada de metanol para que precipite todo el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , por lo que puede haber restos en la muestra de ectoína obtenida al final. Así que sería necesario estudiar estas dos etapas en el caso de querer mejorar la pureza de la ectoína obtenida.

## 8. RESUMEN RESULTADOS EXPERIMENTALES.

El primer paso dado a la hora de realizar este experimento es obtener la biomasa con la que se va a trabajar. Así, sometimos el caldo de cultivo recibido a un proceso de centrifugación, en el cual se comprobó que las células no se rompían durante el proceso de centrifugado, lo que implicaba la posibilidad de devolverlas al biorreactor una vez concluido el proceso de extracción. Además, también se comprobó que se podían realizar dos centrifugados sin perder ectoína durante el proceso, lo que nos permite centrifugar una mayor cantidad de tiempo y a mayor velocidad, logrando reducir la humedad dentro de las bacterias y con ello la cantidad de sal presente en las mismas, que nos ayuda a una menor liberación de la misma en la etapa de bio-milking, logrando un menor coste económico y de tiempo en la etapa de electrodiálisis.

En la siguiente etapa, una vez se ha obtenido la biomasa húmeda, se realiza el bio-milking, para lo que se probó con diferentes cantidades de agua desde 0.01 L agua destilada/g hasta 0.25 L agua destilada/g. Así, aunque las concentraciones de TOC para todos los bio-milking eran similares, se observó que había diferencias claras tanto en la liberación de SV como de ectoína para volúmenes por encima y por debajo de 0.06 L/g de biomasa. También se comprobó que para valores de 0.06 L/g en adelante, la ectoína liberada iba aumentando hasta lograr la liberación del 100% de la ectoína presente en el bio-milking de 0.25 L/g. En este bio-milking se obtuvo que las ST son de 0.1875 g/kg, mientras que los volátiles, entre los que se encuentra la ectoína, son de 0.13 g/kg, por lo que podemos decir que la cantidad de sales es aproximadamente la mitad que la cantidad de volátiles que tenemos en la muestra, teniendo como objetivo en las etapas posteriores eliminarla. Por otro lado, en la disolución preparada con 0.02 L/g, el porcentaje de SV respecto a ST es mucho menor, teniendo 0.168 g/kg de ST y 0.11 g/kg de SV. Donde podemos apreciar la variación en las muestras es en la relación ectoína/ST, de 0.0076 g/kg en el caso de 0.25L/g y de 0.0003 g/kg en el de 0.02L/g, al igual que la relación de ectoína/SV, de 0.01 g/kg en el caso de 0.25L/g y de 0.0005 g/kg en el caso de 0.02L/g.

El siguiente paso dentro de nuestro proceso de purificación es la electrodiálisis. El objetivo era reducir el contenido de sal de las disoluciones introducidas. A pesar de que la concentración de sal era mucho mayor en la muestra correspondiente al bio-milking de 0.02L/g, se logró llevar ambas disoluciones a la misma concentración de sal a la salida, aunque sí que nos tomó más tiempo lograrlo en la de 0.02L/g. Así, a la salida del proceso teníamos que la totalidad de los sólidos en ambas muestras eran SV, por lo que logramos eliminar la totalidad de la sal presente. A nivel de ectoína, tras la desalinización se aprecia que se pierde una parte, recuperando únicamente un 67.33 % en el caso del bio-milking de 0.25 L/g y un 60.1 % en el caso del bio-milking con 0.02 L/g, por lo que parece necesario optimizar esta etapa de proceso.

A continuación, se realiza el paso por la columna de intercambio iónico. En este caso trabajamos con la resina DOWEX 50W x8 en condiciones ambientales. Para lograr una velocidad de flujo constante en esta columna se trabajó con dos bombas peristálticas, obteniendo que la velocidad adecuada para un flujo constante era de 0.025 L/min, lo que equivale a una velocidad superficial de 0.059 cm/s. Esta columna de intercambio iónico opera como un lecho fijo, por lo que la ectoína sale tras cierto tiempo de paso del eluyente (disolución de NaOH 1.3 M) por la misma. En este experimento se trabajó con cuatro volúmenes de 0.3 L de disolución, ya que era el volumen de lecho. En los resultados se aprecia que en los dos primeros pasos no hay ectoína, lo que hace indicar que la ectoína sale de la columna tras el 3<sup>er</sup> paso, lo que equivale a unos 24 minutos. Aquí es probable que se haya cometido un fallo a la hora de decidir el volumen de eluyente necesario, ya que parece que con el 4<sup>o</sup> paso todavía quedaba ectoína en la columna, por lo que lo ideal en futuros experimentos sería trabajar con volúmenes de disolución mayores para lograr extraer toda la ectoína de la columna. Otro problema surgido en esta fase fue el modo de regenerar la columna, ya que según las indicaciones del fabricante se debía regenerar utilizando una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 N, pero según estudios previos (Pérez et al., 2022) se regeneraba con la propia disolución de NaOH 1.3 M. Durante el experimento se trató de realizar una prueba haciendo pasar dos disoluciones de concentración de ectoína conocida e idéntica habiendo regenerado la columna de una manera diferente para cada una de las disoluciones, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, por lo que es un punto en el que habría que trabajar en próximos ensayos. A nivel de resultados de ectoína, se obtuvo una recuperación del 53.96 % respecto a la anterior etapa, siendo un porcentaje bastante bajo para el objetivo.

Seguidamente, se realizó el proceso de precipitación con metanol y posterior filtrado. Al desconocer los niveles de ectoína debido a la no disponibilidad del cromatógrafo, se optó por añadir 0.2 L metanol/muestra. Tras el proceso de filtrado, se recuperó una cantidad de ectoína correspondiente al 57.1% de la presente en el paso anterior, pudiendo deberse este bajo rendimiento a coprecipitación de ectoína junto a los sulfatos o a degradación de ectoína durante esta etapa. Este es otro punto sobre el que trabajar en posteriores estudios.

Por último, se realizó la evaporación del metanol para obtener finalmente la ectoína purificada, para lo que se trabajó en un rotavapor con un baño a 50°C y una bomba de vacío que generaba un descenso de presión a 0.2 bar. Una vez obtenida la ectoína, se pesó la muestra, obteniendo un peso de la muestra de 0.6432 g.

Teniendo en cuenta que había una cantidad de ectoína de 0.5706 g en la muestra de metanol, podemos decir que la pureza de nuestra muestra es del 88.7 %, que está cerca del objetivo, pero no lo cumple, ya que este era del 95 %, por lo que habrá que implementar mejoras.

Como conclusión, se recupera el 20.7% de la ectoína que se introduce en el proceso, lo que implica una gran pérdida de la misma a lo largo de la purificación, por lo que habría que tratar de implementar mejoras en el proceso en futuras etapas, como lo comentado en la columna de intercambio iónico de trabajar con mayor volumen de la disolución de NaOH 1.3 M o evitar la degradación de la misma durante el proceso. Como también se ha comentado, habría que tratar de medir la cantidad de SV y ST en todas las etapas en futuras investigaciones para tener un conocimiento más profundo del efecto de cada etapa en el rendimiento y en la pureza de la ectoína recuperada.



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## 9. CÁLCULO Y DIMENSIONADO DE UNA PLANTA DE PURIFICACIÓN.

### 9.1. DISEÑO DE LA PLANTA.

#### 9.1.1. BASES DE DISEÑO DEL PROCESO.

##### 9.1.1.1. Capacidad de producción.

La planta de purificación de ectoína descrita en este proyecto opera de forma discontinua con el objetivo de poder trabajar con la columna de intercambio iónico, ya que esto es un proceso discontinuo que necesita un tiempo de elución, regeneración y lavado, por lo que operará 8 horas diarias los 365 días del año, obteniendo, al 100 % de su capacidad, unos 20 kg ectoína/ año.

En el caso de una sobreproducción del 20 %, la planta obtendría 24 kg ectoína/año, mientras que en el caso de una producción al 75 % de la capacidad total, el producto obtenido sería de 15 kg ectoína/año.

##### 9.1.1.2. Especificaciones de materia prima.

La materia prima a partir de la cual lograremos obtener la ectoína, como ya se ha comentado, es el CH<sub>4</sub> contenido en una corriente de gas residual con la que alimentaremos a nuestras bacterias metanótrofas, capaces de acumular ectoína. Como concentración inicial de ectoína consideraremos 5 mg ectoína/g biomasa húmeda, lo que implica que será necesaria una optimización del biorreactor en futuras investigaciones. La biomasa presentará una humedad del 892.9 g/kg biomasa, además de 68,7 g cenizas/kg biomasa y 38.4 g SV/kg.

A continuación, para la purificación, nuestra alimentación será la disolución donde ya se encuentra disuelta la ectoína y ya se ha eliminado la biomasa.

Como producto obtendremos ectoína al 95% de pureza, generada con un rendimiento del 85% respecto a la ectoína introducida.

##### 9.1.1.3. Límites de batería del proyecto.

El proceso se dividirá en dos secciones principales. La primera comprenderá la zona del bio-milking con la posterior centrifugación para separar la biomasa, mientras que en la segunda será la fase de purificación, con la columna de intercambio iónico y el cristalizador.

##### 9.1.1.4. Localización.

La planta está situada en Valladolid, concretamente en el Parque Tecnológico de Boecillo, situado a 25 minutos del centro de Valladolid.



Figura 18. Vista satélite del Parque Tecnológico de Boecillo.

Esta localización sitúa la planta cerca de los servicios auxiliares necesarios tales como acceso a la red municipal de agua potable, redes de saneamiento y abastecimiento energético, y cuenta con grandes facilidades para el posterior transporte del producto obtenido, como la red ferroviaria y de carreteras.

#### 9.1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.

Se realizó el diseño de una planta de demostración de extracción y purificación de ectoína partiendo de un biocultivo de bacterias metanótrofas como materia prima inicial, que van a ser alimentadas con una corriente residual que contiene metano y un medio de cultivo de alta salinidad.

En la planta inicialmente encontraremos un biorreactor, V-101, donde habrá un cultivo de bacterias metanótrofas, las cuales serán extraídas del propio reactor junto con una corriente del medio y se llevarán a la centrifugadora V-104, donde obtendremos la biomasa libre de líquido, con una humedad del 892.9 g de agua/kg biomasa

El propio proceso de extracción comienza ahora. Dicho proceso consiste en una extracción de la ectoína, que, como ya se ha comentado, se realiza mediante un bio-milking. Esto tiene lugar en la mezcladora V-105, donde se emplea agua a temperatura ambiente, la cual se añade a la biomasa obtenida previamente del biorreactor. De esta etapa se obtiene una corriente líquida compuesta, entre otras cosas, de ectoína, sales, otros compuestos volátiles y biomasa, que será tratada posteriormente.

A continuación, esta corriente líquida se lleva de nuevo a la centrifugadora (V-104) para separar la fracción sólida (la biomasa) de la corriente líquida (agua con ectoína, entre otras cosas). La biomasa será devuelta al biorreactor, mientras que la disolución de ectoína se lleva a un proceso de electrodiálisis, V-201, con la idea de eliminar la mayor cantidad posible de NaCl, procedente del medio salino de cultivo. La salida de la electrodiálisis se controlará mediante la medida continua de la conductividad de la disolución. Tras ello, a la disolución se le añade HCl 1.3 M hasta

conseguir un pH de la disolución de 1.5, logrando así que se ionice la ectoína y pueda ser adsorbida por la resina que se encuentra en las columnas de intercambio iónico, colocadas en serie, C-211 y C-213.

Una vez la disolución ha pasado en flujo descendente, a través de las columnas, se hace pasar por ellas una disolución de NaOH 1.3 M, mediante la cual se eluye la ectoína adsorbida. Esta resina será regenerada con una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 N, lo que obliga a trabajar en un proceso discontinuo. Es posible que pueda servir con la propia disolución de NaOH 1.3 M que se hace pasar por la columna para recuperar la ectoína, como se ha comentado en el apartado del desarrollo experimental, pero habría que hacer una investigación más exhaustiva acerca de este tema. Por último, se realiza un lavado del lecho en sentido ascendente.

Una vez se obtiene la disolución de NaOH con ectoína, esta se acidifica con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% masa, hasta lograr un pH neutro. Una vez neutralizada, la disolución se lleva a un evaporador, E-301, con el objetivo de obtener una disolución al 95 % masa de ectoína, este evaporador opera a 60 °C y 0.2 bar.

Seguidamente, la disolución con el producto deseado se lleva a la mezcladora V-305, donde se añaden 10 kg metanol por cada kg de ectoína, lo que hace que precipiten sustancias no deseadas, que se eliminan en el filtro que hay a continuación, F-306.

Por último, la disolución, ya libre de sólidos, se lleva al cristizador evaporativo V-309, donde se elimina gran parte del metanol, obteniendo cristales de ectoína. Estos se llevan a un secadero, E-310, donde se elimina el metanol y los restos de agua que aún quedan en el sólido.

El diagrama de flujo del proceso se muestra en el [ANEXO 1](#).

La planta constará de los siguientes elementos:

- ➔ Mezcladoras (V-105, V-305): para adicionar diferentes compuestos a la disolución de ectoína, homogeneizando las disoluciones para lograr su extracción.
- ➔ Centrífugas (V-104): centrífuga que se utilizará para separar la biomasa de diferentes disoluciones.
- ➔ Equipo de electrodiálisis (V-201): para desalinizar la disolución una vez se elimina la biomasa.
- ➔ Columnas de intercambio iónico en serie (C-211 y C-213): para extraer la ectoína de la disolución del bio-milking, quedando retenida en la resina de la propia columna.
- ➔ Evaporador (E-301): para eliminar el líquido sobrante en alguna etapa de la purificación de la ectoína.
- ➔ Cristizador evaporativo (V-309): para lograr la evaporación del metanol y obtener así los cristales de la ectoína.
- ➔ Secadero de sólidos (E-310): para eliminar el exceso de líquido que pueda haber quedado retenido por el producto final tras la cristalización.

- ➔ Filtro (F-306): para eliminar los sulfatos presentes en la disolución, los cuales precipitan mediante la adición del metanol.
- ➔ Tanques de almacenamiento (V-108, V-203, V-204, V-206, V-302): tanques de almacenamiento de los diferentes compuestos durante el proceso para poder controlarlo de manera discontinua.
- ➔ Condensador (E-307): para recuperar el metanol una vez evaporado y devolverlo al proceso.

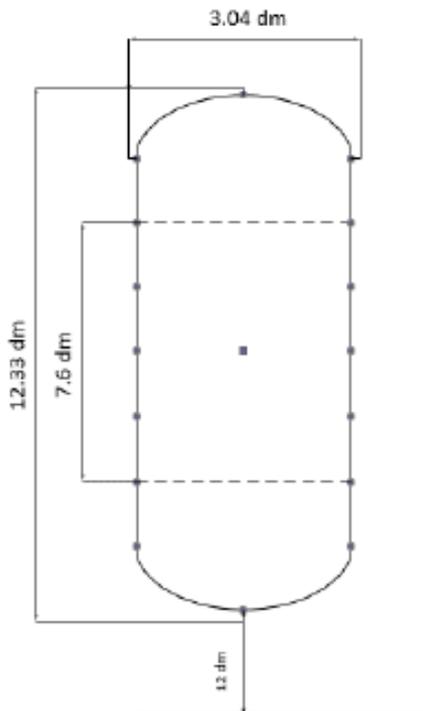
### 9.1.3. DISEÑO DE EQUIPOS.

Los equipos que se van a diseñar son la columna de intercambio iónico (C-211, C-213), una bomba (P-212), un tanque de almacenamiento (V-204) y una tubería.

Los cálculos pertinentes para el diseño de los equipos se muestran desarrollados en el [ANEXO 2: CÁLCULOS](#).

9.1.3.1. Diseño de la columna de intercambio iónico C-211.

 Universidad de Valladolid				<b>HOJA DE DATOS COLUMNA DE INTERCAMBIO</b>			
REV.	0			TRABAJO N°	3		
FECHA	3-jul-2023			UNIDAD	C-114		
POR	PSH			CLIENTE	UVA		
APROBADSBR				LOCALIZACIÓN	VALLADOLID		
REV.							
1	N° de equipo	C-114	Cantidad	12			
2	Servicio	Columna de intercambio para adsober la ectolna.					
3	Fluido	Agua en disolución con NaOH, H2SO4 y ectolna					
4	Volumen	0.089 m <sup>3</sup>					
5	Diámetro	3.04 dm	Altura	12.33 dm			
6	Horizontal o Vertical	Vertical					
7	Demister	No	Δ P	- bar	Espesor	- mm	
8							
9		Presión	bar g	TEMPERATURA °C			
10		Operación	Diseño	Operación	Diseño		
11	Pared	0.2	3,5 Nota 3	20	40		
12	Encamisado	-	-	-	-		
13	Bobina	-	-	-	-		
14							
15		MATERIAL		TOL. CORRO.			
16	Pared	SS		Nota 1 mm			
17	Cabezas	SS		Nota 1 mm			
18	Encamisado	-		mm			
19	Bobina	-		mm			
20	Demister	-		mm			
21							
22	Revestimiento interno	NO		Espesor - mm			
23	Tipo de cabezal	Hemisférico					
24	Código	ASME VIII Div 1					
25	Altura de lecho	7.6 dm					
26	Gravedad específica	0.804 @ 211 °C					
27	Condiciones de vapor de sa	PV		bar g @ 150 °C			
28	Alivio de tensión por razones de proces	NO					
29	Elevación mínima (BTL al suelo)	12 dm					
30	Aislamiento: Tipo	HC					
31		Espesor		Nota 1 mm			
32							
33							
34	BOQUILLAS						
35	N°	Cantidad	Tamaño	Servicio			
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43	<b>NOTAS</b>						
44	(1) Por estudiar en etapas posteriores						
45	(2) El equipo puede ser sometido a steam uot (150°C/PV) usando LPS (Td = 150°C, Pd = 5 barg).						
46	(3) El recipiente puede llenarse en exceso durante un funcionamiento anormal. El vendedor debe considerar la columna llena de líquido para determinar la presión de diseño.						
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							



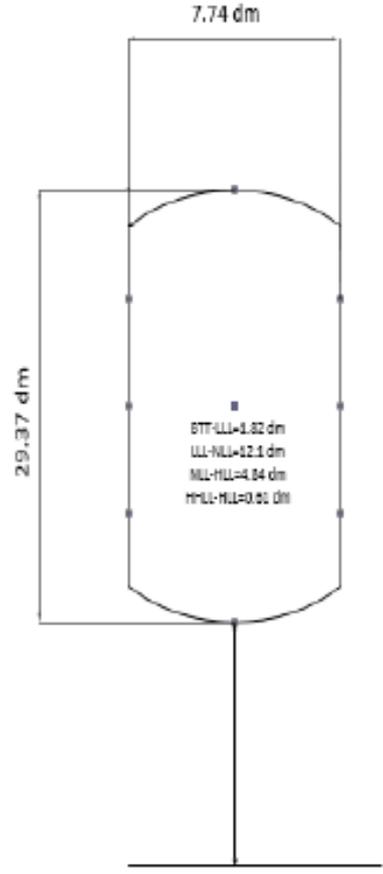
9.1.3.2. Diseño de la bomba P-212.

		<b>HOJA DE DATOS DE LA BOMBA</b>							
REV.	0				TRABAJO N°	3			
DATE	3-Jul-23				UNIDAD	-			
BY	PSH				CLIENTE	UVA			
APPR'V	SBR				LOCALIZACIÓN	VALLADOLID			
REV.									
1	NÚMERO DE EQUIPO	P-212							
2	SERVICIO	Bombear las disoluciones que atraviesan las columnas							
3	TIPO	Centrífuga							
4	N° DE BOMBAS	6							
5	EN OPERACIÓN	6							
6	REPUESTO	0							
7		MOTOR	X						
8		TURBINA							
9		OTRAS							
10	LÍQUIDO BOMBEADO	Agua con NaOH, H2SO4 o ectoína en disolución							
11	CASO DE OPERACIÓN	Mínimo	Normal	Rated					
12	TEMPERATURA DE IMPULSIÓN	°C	20	20	20				
13	VISCOSIDAD (@ T)	cP	1	1	1				
14	PRESIÓN DE VAPOR (@T)	bar a	1	1	1				
15	DENSIDAD (@T)	kg/m <sup>3</sup>	1000	1000	1000				
16									
17	CAPACIDAD NORMAL	m <sup>3</sup> /h	0,078	0,1542					
18	CAPACIDAD DE DISEÑO	m <sup>3</sup> /h			0,169				
19	PRESIÓN DE DESCARGA	bar g	1,73	1,47	1,33				
20	PRESIÓN DE SUCCIÓN	bar g	0,5	0,34	0,28				
21	DIFERENCIA DE PRESIÓN	Bar	1,23	1,13	1,05				
22	CABEZAL	m	12,6	11,5	10,7				
23	NPSH MÍNIMO DISPONIBLE	m			2.1 (Nota 2)				
24	PRESIÓN MÁXIMA DE SUCCIÓN	bar g	4,08						
25	PRESIÓN DE SHUTOFF	bar g	5.40 (Nota 3)						
26	TRABAJO (Continuo/Intermitente)	Intermitente							
27	MÍNIMO FLUJO CIRCULANTE	Dependiente de la válvula de control							
28	CORROSIÓN O EROSIÓN DEBIDA A	Nota 1							
29	SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN	-							
30	LOCALIZACIÓN (INTERIOR/EXTERIOR)	Interior							
31	POTENCIA HIDRÁULICA CON EL FLUJO DE DISEÑO	kw	0,0049						
32	MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN	CARCASA	SS						
33		IMPULSOR	SS						
34		EJE	SS						
35	<b>NOTAS</b>								
36	(1) Máximo contenido en H2SO4 0,25 N de la disolución que circula por la bomba								
37	(2) Será estudiado en posteriores etapas								
38	(3) Consultar al vendedor								
39									
40									
41									
42									
43									
44									



### 9.1.3.3. Diseño del tanque V-204.

 Universidad de Valladolid				<b>HOJA DE DATOS TANQUE DE ALMACENAMIENTO</b>			
REV.	0			TRABAJO N°	3		
FECHA	3-jul-2023			UNIDAD	V-116		
POR	PSH			CLIENTE	UVA		
APROBAC	SBR			LOCALIZACIÓN	VALLADOLID		
REV.							
1	N° de equipo	120-D-101		Cantidad	1		
2	Servicio	Tanque de almacenamiento de agua destilada					
3	Fluido	Agua destilada					
4	Volumen	1,38 m <sup>3</sup>					
5	Diámetro	7.74 mm	Altura	29.37 dm			
6	Horizontal o Vertical	Horizontal					
7	Demister	-	Δ P	-	bar	Espesor	
8							
9			PRESIÓN bar g		TEMPERATURA °C		
10			Operación	Diseño	Operación	Diseño	
11	Pared	0	3,5	20	40		
12	Encamisado	-	-	-	-		
13	Bobina	-	-	-	-		
14							
15			MATERIAL		TOL. CORROSIÓN		
16	Pared	CS		Nota 1 mm			
17	Cabezas	CS		Nota 1 mm			
18	Encamisado	-		- mm			
19	Bobina	-		- mm			
20	Demister	-		-			
21							
22	Revestimiento inter	NO		Espesor - mm			
23	Tipo de cabezal	2:1 Elipsoidal					
24	Código	ASME VIII Div 1					
25	Altura de líquido	65.80 dm					
26	Gravedad específica	0,657	@	40 °C			
27	Condiciones de salida del vapor	FV	bar g	@	## °C		
28	Tensión por motivos del proceso	NO					
29	Mínima elevación del suelo al tanque	- mm					
30	Aislamiento	Tipo		No aislado			
31		Espesor		mm			
32							
33							
34	BOQUILLAS						
35	N°	Cantidad	Tamaño	Servicio			
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43	<b>NOTAS</b>						
44	(1) Será analizado en posteriores etapas						
45	(2) EL tanque puede ser sometido a una salida de vapor (150°C/FV) usando LPS (Td = 150°C, Pd = 5 barg).						
46							
47							
48							
49							
50							
51							
52							
53							
54							
55							
56							



#### 9.1.3.4. Diseño de la tubería que conecta la columna C-211 con la bomba P-212.

Por esta tubería circula  $2.57 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{minuto}$ , que es el flujo que circula por la columna C-211. Teniendo en cuenta que la velocidad típica de fluido líquido que circula por tuberías es de 1-3 m/s, podemos con esto hallar el diámetro de nuestra tubería a partir de la siguiente expresión:

$$A = \frac{2.57 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{minuto}}{60 \frac{m}{minuto}} = 4.3 \cdot 10^{-5} m^2 \rightarrow D = 0.23 dm$$

Al tratarse de una línea de succión de bomba, presenta una  $\Delta P_{m\acute{a}x}$  unitaria de 0.8 bar/km.

El material utilizado en estas tuberías será acero al carbono (CS), ya que no trabajaremos con T muy bajas en este proceso y este material aguanta hasta temperaturas de -29 °C, además de poder trabajar con cloruros. No puede trabajar con compuestos corrosivos en este tipo de materiales, pero al hacer pasar por ella también una disolución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> someteremos la tubería a un tratamiento provisto por NACE (The National Association of Corrosion Engineers).

Según el diseño de la bomba P-212, nuestra presión de shutoff es de 5.4 barg, por lo que, según el código ASME B31.3, la  $P_{dise\tilde{n}o}$  de nuestra tubería es de ese mismo valor, 5.4 barg. Conocido esto podemos hallar el espesor mínimo de nuestra tubería a partir de la siguiente expresión:

$$t = \left( \frac{P \cdot D_0}{2 \cdot S \cdot E} + C \right) \cdot M \quad \text{Ecuación 10.1.1}$$

Donde t es el espesor mínimo del tubo en pulgadas (in), P la presión interna de diseño en psig, D<sub>0</sub> el diámetro externo de la tubería en in, S la tensión máxima admisible del material a T<sub>diseño</sub>, lb<sub>f</sub>/in<sup>2</sup>, E la eficiencia de soldadura (valor típico 0.8), M la tolerancia de fabricación (1.125 valor típico) y C el sobreespesor por corrosión (0.12 in como valor típico). Así, recogiendo los valores necesarios para hallar el espesor, obtenemos el siguiente valor:

$$t = \left( \frac{78.32 \cdot 0.91}{2 \cdot 15000 \cdot 0.8} + 0.12 \right) \cdot 1.125 = 0.1383 in$$

Con esto ya conocemos todos los parámetros necesarios para el diseño de nuestra tubería.

## 10. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD ECONÓMICA DEL PROYECTO.

### 10.1. COSTES DE CAPITAL.

El método de Lang se ha empleado en este estudio para estimar el TIC en este estudio. Este método se basa en una serie de múltiples factores, permitiendo así estimar de los costes totales de instalación de los equipos basándose en el precio del equipo (PEC). Para el caso de nuestra instalación, se utilizará un factor de Lang de 4.09, ya que es el valor adecuado según la bibliografía para un proceso con fases tanto líquidas como sólidas en nuestra localización, Valladolid.

	New Delhi	Madrid	Doha
<b>Equipment</b>	1.00	1.00	1.00
+ Equipment installation labor <sup>a</sup>	0.03	0.38	0.94
+ Instrumentation and controls	0.12	0.12	0.12
+ Piping	0.31	0.31	0.31
+ Electrical installations	0.10	0.10	0.10
+ Buildings	0.29	0.29	0.29
+ Yard improvements <sup>b</sup>	0.01	0.10	0.25
+ Service facilities	0.54	0.54	0.54
+ Land	0.06	0.06	0.06
<b>Direct plant cost</b>	2.45	2.90	3.60
+ Engineering and supervision <sup>c</sup>	0.02	0.32	0.79
+ Construction expenses <sup>d</sup>	0.02	0.34	0.04
<b>Direct and indirect costs</b>	2.50	3.56	5.23
+ Contractor's fee	0.12	0.18	0.26
+ Contingency	0.25	0.36	0.52
<b>Total depreciable costs (Lang Factor)</b>	2.87	4.09	6.01

Tabla 8. Factor de Lang calculado para Nueva Dehli, Madrid y Doha.

### 10.2. ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD.

Hay varios factores que pueden afectar al precio de la obtención y purificación de la ectoína. Así, la ubicación afecta al coste de algunos elementos básicos, como son el agua, la electricidad o los salario. En la tabla 9 se puede observar la variación de precios entre las diferentes ciudades.

City	Energy (€·kWh <sup>-1</sup> )	Water (€·m <sup>-3</sup> )	Wage (€·y <sup>-1</sup> )	Price level
New Delhi	0.07	0.58	1945.0	0.07
Johannesburg	0.07	1.95	5541.3	0.20
Singapore	0.16	0.43	5090.8	0.18
Shanghai	0.07	0.19	9532.1	0.34
Sofia	0.08	1.00	8779.8	0.32
Sao Paulo	0.16	2.13	8376.1	0.30
Madrid	0.10	1.89	27858.2	1.00
Toronto	0.08	2.28	39779.8	1.43
Tokyo	0.17	1.90	38266.1	1.37
Sydney	0.21	1.27	50550.5	1.81
Copenhagen	0.08	5.59	58715.6	2.11
Los Angeles	0.12	2.70	60412.8	2.17
Doha	0.02	1.21	68557.8	2.46

Tabla 9. Coste medio de los diferentes servicios auxiliares en diferentes ciudades.

Así, el precio de venta de la ectoína también influye en el análisis de sensibilidad, como es lógico. En este escenario, donde no sabemos si la ectoína sigue un precio basado en el coste de producción o en el coste de mercado, los recientes estudios de la alta rentabilidad del biogás para la obtención de ectoína, apoyados por la amplia diferencia entre los costes de operación y el precio de venta, abren el debate

de cómo la implantación de esta tecnología afectará al precio de la ectoína y viceversa. Por ello, para este estudio de sensibilidad, tomaremos un precio de la ectoína de 1000 €/kg.

Dentro de los factores que afectan al coste de producción y purificación nos encontramos las limitaciones biotecnológicas, como el diseño de biorreactores mejorados de transferencia de masa gas-líquido o el desarrollo de procesos de extracción y purificación rentables y eficientes, las cuales han sido identificados en la bibliografía como las principales restricciones biotecnológicas de los productos basados en el aprovechamiento de CH<sub>4</sub>. Estas restricciones pueden verse reflejadas en la tabla 10, donde se muestra los valores mínimos y máximos de los diferentes parámetros valorados en este estudio de sensibilidad consultado.

Biotechnological limitation	Parameter	Min	Base	Max
BCB performance	RE-CH <sub>4</sub> (%)	45	90	100
	CH <sub>4</sub> -BC (g·m <sup>-3</sup> ·h <sup>-1</sup> )	74	148	184
Microbial yields	Biomass yield (g X·g <sup>-1</sup> CH <sub>4</sub> )	0.2	0.4	0.6
	Ectoïne accumulation (mg ectoïne·g <sup>-1</sup> X)	35	70	105
IEX resin characteristics	Ectoïne excretion (%)	42.5	85	100
	Ectoïne recovery (%)	45	90	100
	Resin capacity (kg ectoïne·kg <sup>-1</sup> resin)	0.05	0.1	0.125
	Resin density (kg resin·m <sup>-3</sup> resin)	400	800	1000
	Resin lifespan (d)	40	80	100

Tabla 10. Resumen de los valores mínimos y máximos considerados para el análisis de sensibilidad.

Otro origen de las causas que afectan al precio de la producción y purificación de la ectoína es la baja solubilidad de CH<sub>4</sub> (biogás) y O<sub>2</sub> (aire) en cultivos metanotróficos, lo que implica que en el proceso se opere a altos tiempos de residencia de gas (EBRT) y requiere la instalación de grandes superficies de contacto gas-líquido para asegurar una transferencia efectiva de masa entre ambos. De hecho, la puesta en marcha y operación de biorreactores gas-líquido ha sido tomada en cuenta en evaluaciones tecnológico-económicas anteriores como la inversión principal y la etapa de mayor coste de operación en la obtención de productos biológicos basados en CH<sub>4</sub>, como PHAs y ectoína.

Los cultivos de bacterias también afectan al coste de la operación, así, la menor productividad de los metanótrofos en comparación con otros cultivos aparece como la principal desventaja del uso de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub> para la producción de bioproductos a escala industrial.

El último factor influyente sobre los costes de operación es el rendimiento de la columna de intercambio iónico utilizada para la purificación de la ectoína. El uso de resinas de intercambio caras ha sido considerado en otros estudios como el mayor coste en la producción de ectoína, por lo que será determinante la capacidad de

retención de ectoína de la misma, el rendimiento de ectoína recuperada y su recuperación para lograr obtener un proceso rentable. (Pérez et al., 2022)

Conociendo esto se ha realizado por nuestra parte un estudio de la viabilidad económica del proyecto, haciendo un análisis del coste inicial consistente en la compra de los equipos de la planta, así como de las materias primas y los servicios auxiliares.

Se ha realizado además un estudio de la sensibilidad de la inversión con las fluctuaciones en el precio de venta del producto.

La cantidad de producto obtenido a partir de esta planta es de 20 kg ectoína/año.

#### COSTE TOTAL DE LA PLANTA.

Para estimar el coste total de la planta se empleó el método Lang, mediante el cual el coste de la planta se obtiene como el coste de todo el equipo base multiplicado por un factor. Como se encontró en bibliografía, este factor se corresponde con un valor de 4,1.

$$C = F \cdot \Sigma E \quad \text{Ecuación 9.7}$$

Donde C se corresponde con el coste de la planta, F con el factor de Lang previamente comentado y E con el coste de los equipos.

Para estimar el coste de los equipos se consultaron diferentes páginas web de venta de equipos industriales, concluyendo que el precio de la planta a nivel de equipos sería de aproximadamente 62548.06 €.

Así, el desglose del precio de los equipos es el siguiente:

Equipo	Cantidad	Precio unidad (€)
Centrifugadora	1	11890
Tanques de almacenamiento	5	546
Condensador	1	2770
Secadero de sólidos	1	600
Mezcladora	2	1130
Evaporador	1	11902
Columna de intercambio iónico	12	1824
Equipo de electrodiálisis	1	7440
Cristalizador evaporativo	1	3798

Tabla 11. Desglose del coste de los equipos.

El precio de las centrifugadoras fue obtenido a partir del programa CAPCOST, mientras que el resto de equipos se obtuvo su precio de diferentes proveedores encontrados por páginas webs.

Si aplicamos el método de Lang, con un factor F de 4.09 según bibliografía, como ya se ha comentado, obtenemos un coste total de la planta de:

$$C = 4.09 \cdot 62548.06 = 255821.6 \text{ €}$$

ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD ECONÓMICA DE LA PLANTA.

Conociendo el coste total de la planta podemos pasar a realizar un análisis de sensibilidad y rentabilidad de la planta tomando como coste de la ectoína 1000 €/kg ectoína.

Hemos supuesto un tiempo de operación de la planta de unos 20 años, ya que es el tiempo medio de vida de los equipos con los que trabajamos. Considerando ese tiempo de depreciación, con una tasa de depreciación anual del 0.01 %, además de un capital en movimiento del 0.05 % de la inversión inicial, que es del coste total de la planta. Con ello podemos hacer un estudio del tiempo que se tarda en recuperar la inversión inicial y empezar a obtener beneficios:

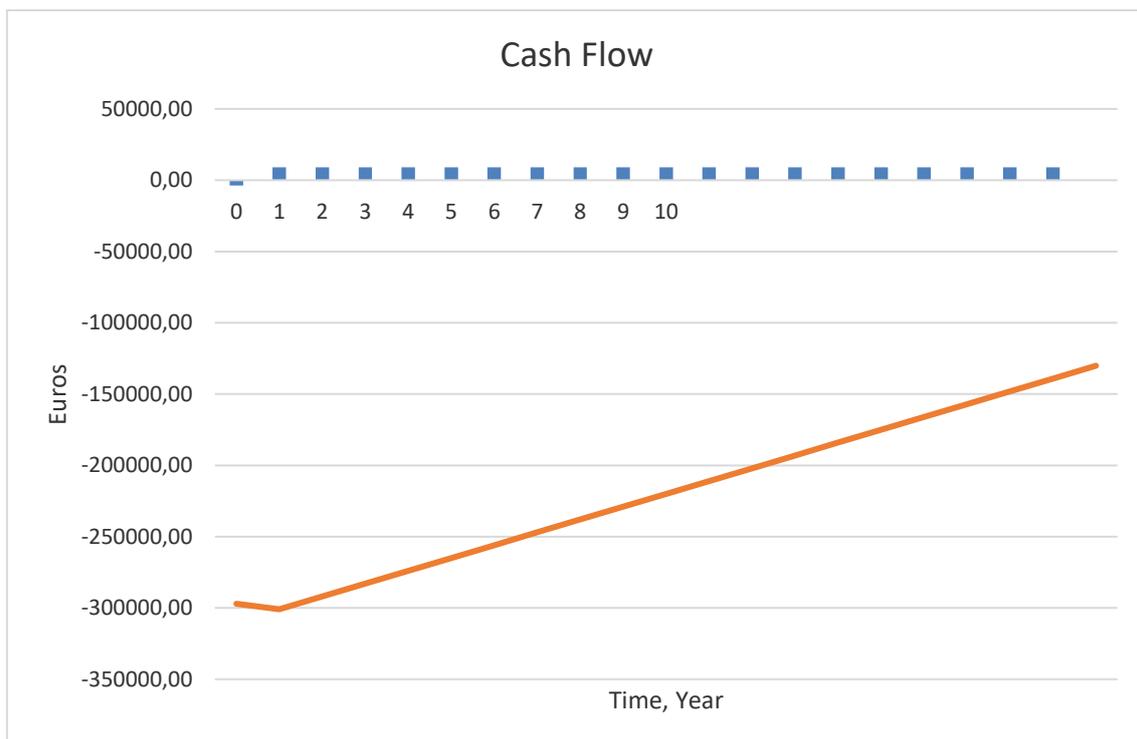


Figura 19. Evolución del flujo de dinero de la planta.

Así, podemos apreciar que la planta no daría beneficios debido al elevado coste de los equipos y la ubicación de la misma, pero al tratarse de una planta piloto dedicada al estudio del proceso y a la idea de optimizarlo esto es relativamente poco importante.

También hemos hallado el estudio de sensibilidad del VAN (valor actual neto) y el TIR (tasa interna de retorno), basado en la variación de los ingresos por venta de la ectoína, en la variación de los costes de operación y la variación del capital invertido, obteniendo los siguientes gráficos:

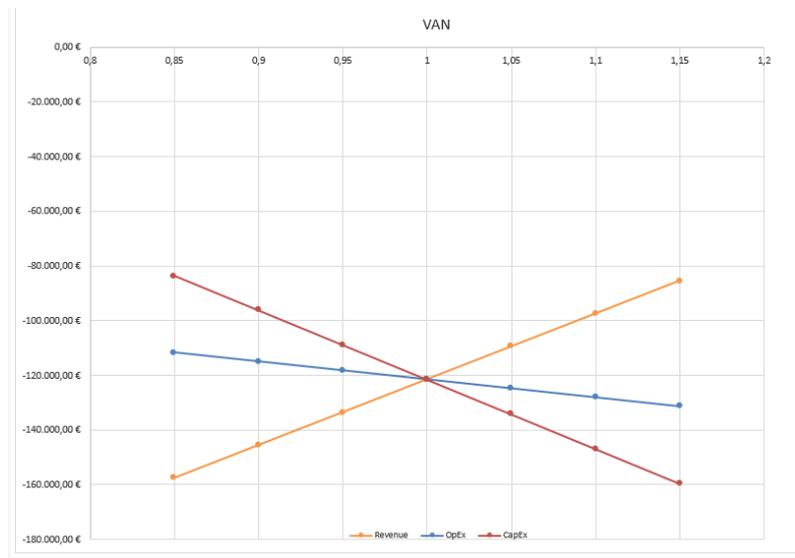


Figura 20. Análisis de sensibilidad del VAN.

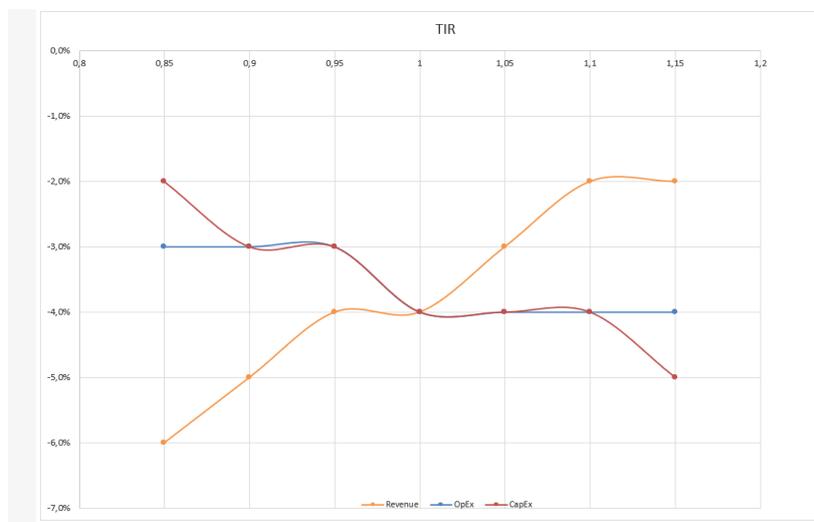


Figura 21. Análisis de sensibilidad del TIR.

Como se puede apreciar, el factor que más afecta a los valores del VAN y el TIR es el precio de venta de la ectoína, lo que es lógico.



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## 11. ANÁLISIS AMBIENTAL DE LA PLANTA.

Dentro de nuestra planta encontramos varias corrientes que salen de ella y que son potenciales contaminantes, por lo que habrá que tratarlas para evitar que sean liberadas al medio ambiente tal cual abandonan el proceso.

La primera corriente que encontramos es el medio salino que se desecha tras el primer centrifugado en la centrífuga V-102. Este medio ha sufrido una gran pérdida de los nutrientes que se encontraban presentes en él ya que han sido consumidos por la biomasa. Sin embargo, esta corriente sigue presentando metales, tales como hierro, cobre, zinc, cobalto o manganeso, aparte de cierta cantidad de NaCl. Por ello será necesario tratar esta corriente siguiendo la normativa vigente, como la Ley 22/2011, del 28 de julio, que establece el marco normativo general para la gestión de residuos en España.

La siguiente corriente a tratar es la que abandona el proceso de electrodiálisis V-201, tratándose de una disolución de agua destilada con NaCl, para cuya gestión habrá que aplicar la Ley 22/2011, del 28 de julio, ya comentada, o el Real Decreto 553/2020, del 2 de junio, por el que se regula el control de la producción y gestión de residuos industriales.

La corriente de agua destilada que abandona el proceso desde las columnas de intercambio C-211 y C-213 no presenta ningún tipo de impureza y únicamente puede encontrar un poco acidificada, por lo que habría que someterla a un tratamiento de neutralización siguiendo también Ley 22/2011.

Las dos últimas corrientes que abandonan la planta de producción en forma de residuos son gaseosas. La primera de ellas, que abandona el primer evaporador E-301, se trata de una disolución neutralizada de NaOH 1,3 M, por lo que puede ser eliminada sin ningún tratamiento más necesario tras su condensación. La segunda abandona el cristalizador, V-309, y se trata únicamente de metanol, por lo que podemos introducirlo en un ciclo de condensación para devolverlo a fase líquida y poder así volverlo a introducir en el proceso, reutilizándolo.



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

## 12. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS.

Como conclusión a este TFG podemos afirmar que una adición de 0.25 L de agua por cada gramo de biomasa húmeda consigue extraer el 100% de la ectoína contenida en las células, sin romper las células, permitiendo la recirculación de las mismas al reactor. El mayor problema a nivel experimental han sido las importantes pérdidas de ectoína durante prácticamente todas las etapas de purificación. Si bien se obtiene resultados esperanzadores en cuanto a pureza del producto, es necesario optimizar las condiciones de todas las unidades de proceso para aumentar significativamente el rendimiento de recuperación de ectoína. Respecto a la ectoína obtenida tras el paso final, se ha conseguido únicamente que presente un 88% de pureza, cuando el objetivo inicial era obtener alrededor del 95% de pureza. Por lo tanto, habría que tratar de aumentar este porcentaje, principalmente reduciendo el aporte de sales tras la electrodiálisis y evitando posibles degradaciones.

Si analizamos el diseño de la planta, debemos tener en cuenta que el objetivo de una planta de demostración como la diseñada no es la rentabilidad. Una producción de 20 kg/año hace que el proyecto no sea rentable. Podrían reducirse gastos abaratando costes, aumentando la concentración de ectoína en las células del biorreactor y reduciendo la cantidad de agua necesaria para el biomilking. Dado que se trata de un proceso discontinuo, gran parte de los equipos (principalmente bombas y mezcladores) podrían utilizarse en varias etapas del proceso, como se ha hecho con las centrifugas.

Como resumen, es necesario mejorar el proceso de purificación, a pesar de que durante este TFG se han hecho avances acerca de la extracción de la ectoína y su posterior tratamiento, es necesario continuar investigando para lograr que este proceso sea válido y rentable a nivel industrial.



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

- Cantera, S., Lebrero, R., Rodríguez, E., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2017a). Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries. *Journal of Cleaner Production*, 152, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.123>
- Cantera, S., Lebrero, R., Rodríguez, S., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2017b). Ectoine bio-milking in methanotrophs: A step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chemical Engineering Journal*, 328, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.027>
- Cantera, S., Lebrero, R., Sadornil, L., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2016). Valorization of CH<sub>4</sub> emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH<sub>4</sub> abatement. *Journal of Environmental Management*, 182, 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.064>
- Carmona-Martínez, A. A., Marcos-Rodrigo, E., Bordel, S., Marín, D., Herrero-Lobo, R., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2021). Elucidating the key environmental parameters during the production of ectoines from biogas by mixed methanotrophic consortia. *Journal of Environmental Management*, 298. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113462>
- CHEERS. (n.d.). Retrieved March 9, 2023, from <https://www.ainia.es/proyectos-publicos/cheers/>
- CHEERS: nuevo Proyecto Europeo de Horizonte Europa empieza - Innovarum. (n.d.). Retrieved March 9, 2023, from <https://innovarum.es/es/horizon-europe-es/cheers-nuevo-proyecto-europeo-de-horizonte-europa-empieza/>
- Condorchem Envitech. (n.d.). *Electrodialisis (ED) y electrodialisis reversible (EDR)*. Retrieved May 27, 2023, from <https://condorchem.com/es/electrodesionizacion/>
- Deep Purple. (n.d.). Retrieved March 9, 2023, from. [www.deep-purple.eu](http://www.deep-purple.eu)
- Delgado, S., Jimena, L. (n.d.). *Co-producción de ectoína y PHB durante el tratamiento de emisiones diluidas de metano Valladolid, julio del 2017, TFG, UVA* <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/25975>
- Ectoína - Wikipedia, la enciclopedia libre. (n.d.). Retrieved March 1, 2023, from <https://es.wikipedia.org/wiki/Ecto%C3%ADna>
- EEA. (n.d.). *Contribution of the different GEI*. Retrieved March 1, 2023 from <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/daviz/contribution-of-the-different-ghgs-6#tab-dashboard-01>
- Estrada, J. M., Lebrero, R., Quijano, G., Pérez, R., Figueroa-González, I., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2014). Methane abatement in a gas-recycling biotrickling

- filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chemical Engineering Journal*, 253, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053>
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic Bacteria. In *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 60, Issue 2, 11–15). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mr.60.2.439-471.1996>
- Hylo Intense colirio lubricante con ectoína - 10 ml. 300 gotas.* (n.d.). Retrieved March 1, 2023, from <https://proffarma.es/salud-y-botiqu%C3%ADn/hylo-intense-colirio-lubricante-con-ecto%C3%ADna-10-ml-300-gotas>
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (n.d.) Retrieved March 1, 2023 from <https://www.ipcc.ch/>
- López, J. C., Quijano, G., Souza, T. S. O., Estrada, J. M., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2013). Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: State of the art and challenges. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Issue 6, pp. 2277–2303). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- Ng, H. S., Wan, P. K., Ng, T. C., & Lan, J. C. W. (2020). Primary purification of intracellular Halomonas salina ectoine using ionic liquids-based aqueous biphasic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(2), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.04.003>
- Núñez, M. G., Anieta, I., Sarmiento, C., López, A., & García, C. (2001). Effects of axial dispersion on fixed bed design for binary ion-exchange under Liquid phase control. In *Rev. Té. Ing. Univ. Zulla* (Vol. 24, Issue 1). <https://produccioncientificaluz.org/index.php/tecnica/article/view/5724>
- Orhan, F., Ceyran, E., & Akincioğlu, A. (2023a). Optimization of ectoine production from *Nesterenkonia xinjiangensis* and one-step ectoine purification. *Bioresource Technology*, 371. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128646>
- Orhan, F., Ceyran, E., & Akincioğlu, A. (2023b). Optimization of ectoine production from *Nesterenkonia xinjiangensis* and one-step ectoine purification. *Bioresource Technology*, 371. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128646>
- Pastor, J. M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L. N., Iborra, J. L., Vargas, C., Nieto, J. J., & Cánovas, M. (2010). Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 782–801. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.06.005>
- Pérez, V., Moltó, J. L., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2021). Ectoine Production from Biogas in Waste Treatment Facilities: A Techno-Economic and Sensitivity Analysis. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(51), 17371–17380. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06772>
- Pérez, V., Moltó, J. L., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2022). Ectoine production from biogas: A sensitivity analysis. Effect of local commodity prices, economy of scale,

- market trends and biotechnological limitations. *Journal of Cleaner Production*, 369. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133440>
- Rodero, M. del R., Herrero-Lobo, R., Pérez, V., & Muñoz, R. (2022). Influence of operational conditions on the performance of biogas bioconversion into ectoines in pilot bubble column bioreactors. *Bioresource Technology*, 358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127398>
- Strong, P. J., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., & Clarke, W. P. (2016). A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. In *Bioresource Technology* (Vol. 215, pp. 314–323).. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.099>
- Strong, P. J., Xie, S., & Clarke, W. P. (2015). Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? In *Environmental Science and Technology* (Vol. 49, Issue 7, pp. 4001–4018). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/es504242n>

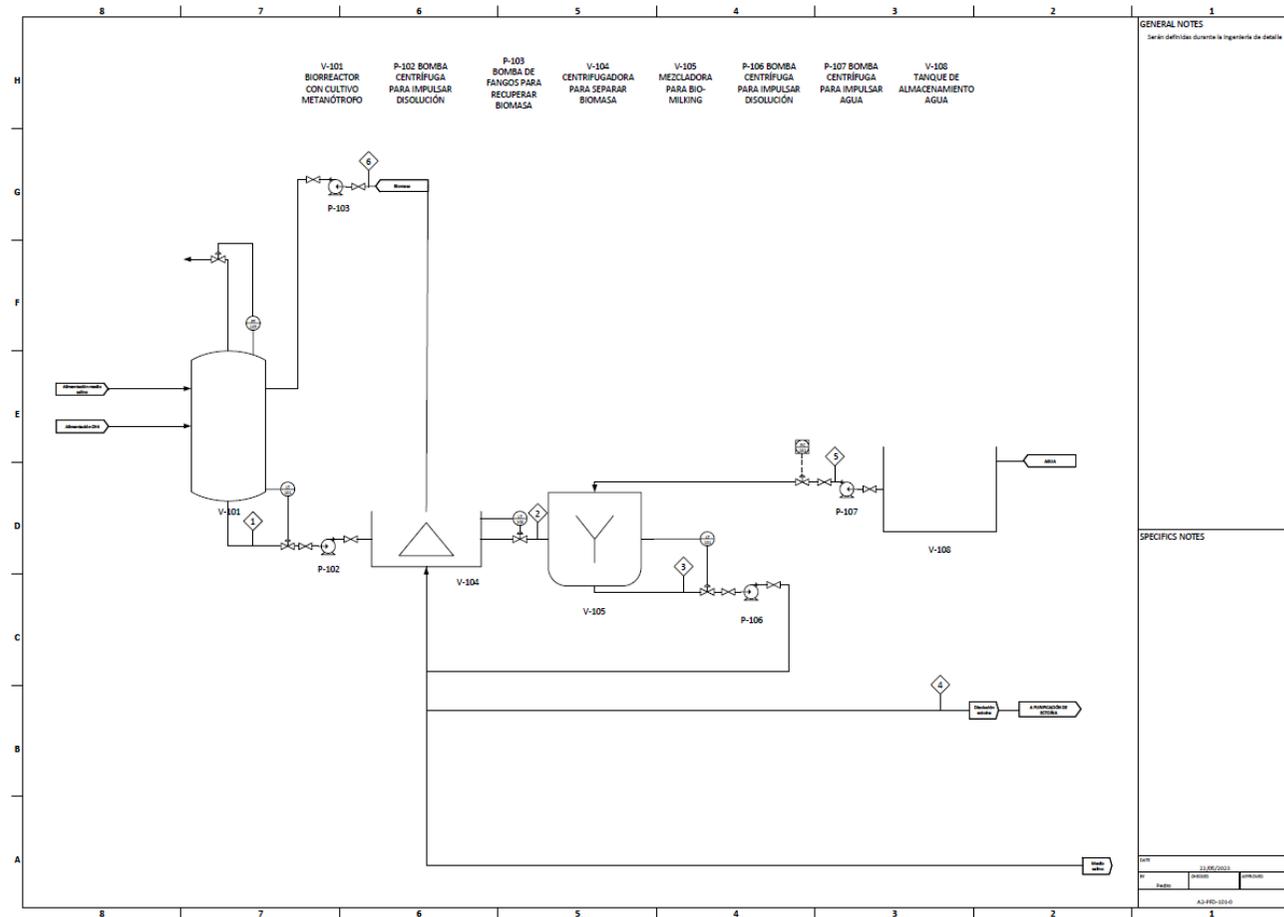


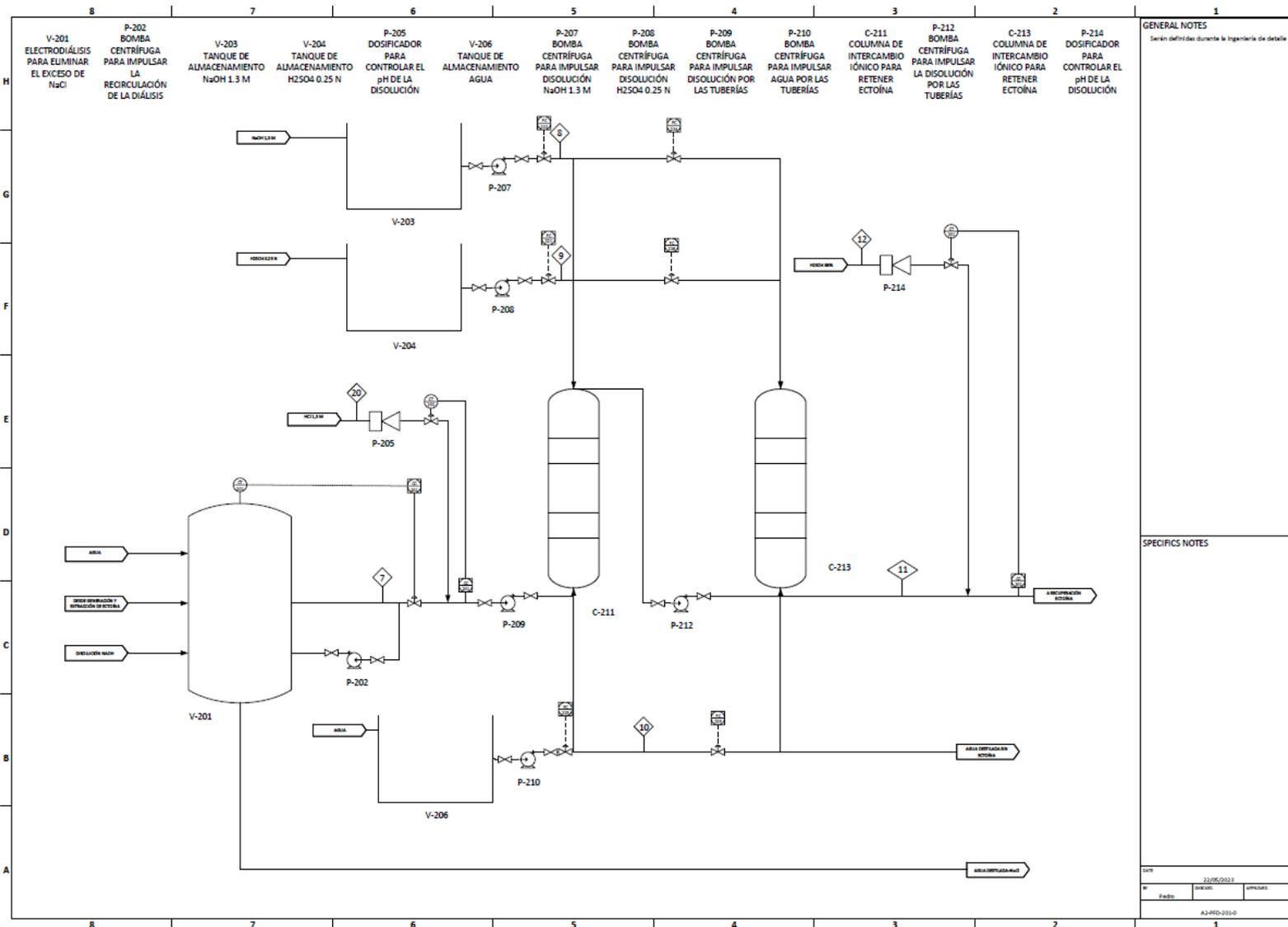
ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

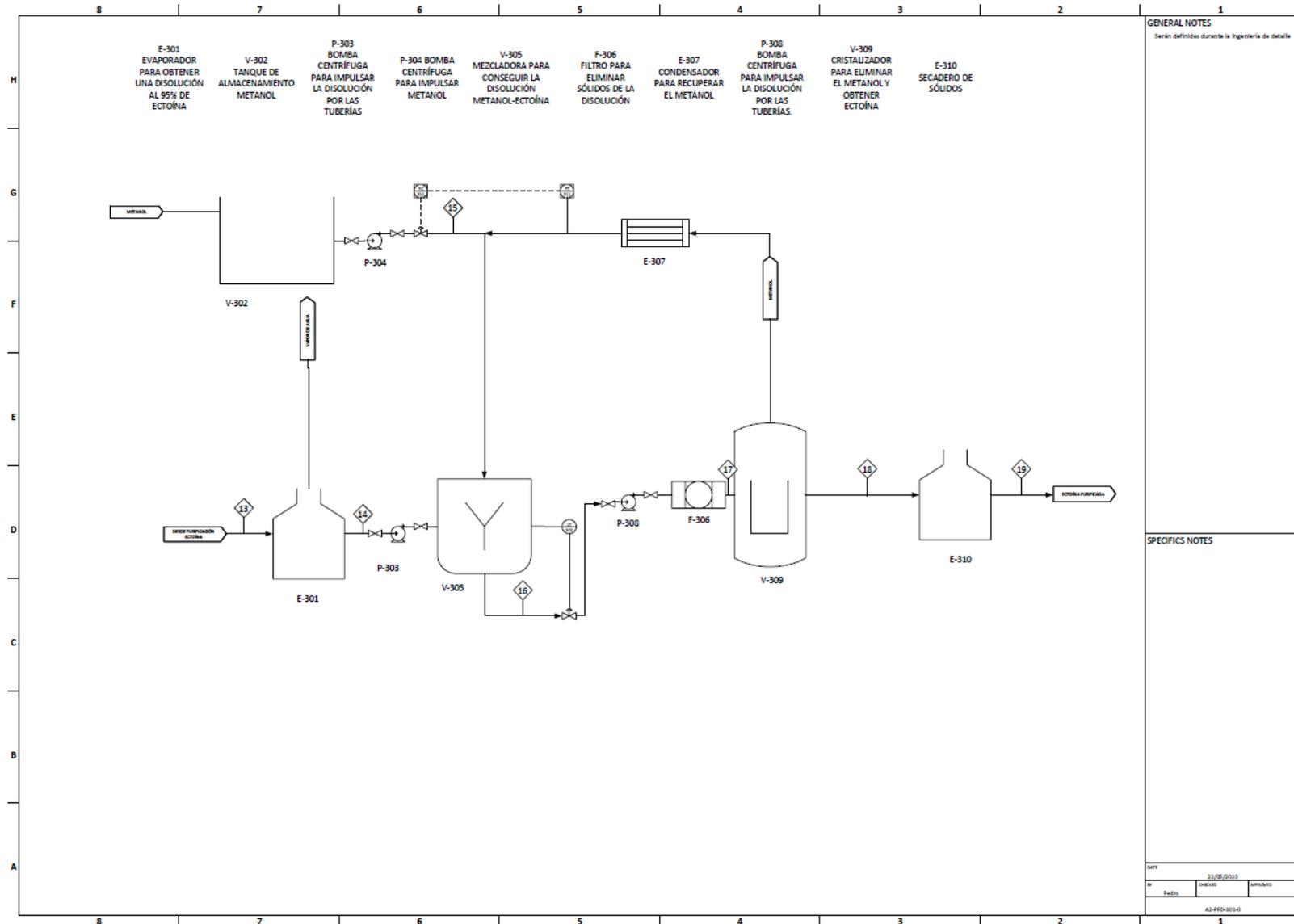


## 14. ANEXOS.

### 14.1. ANEXO 1: PLANOS.







## 14.2. ANEXO 2: CÁLCULOS.

### 14.2.1. COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

En una columna de adsorción, el tamaño del lecho adsorbente está determinado por la velocidad de flujo del líquido y por el tiempo de ciclo deseado.

Así, nosotros a nivel de laboratorio, hemos obtenido la fracción de lecho usado ( $FLU_1$ ), la longitud de lecho no usado ( $L_{UNB1}$ ), la longitud de lecho usado ( $L_{b1}$ ), la capacidad de lecho útil ( $q_{b1}$ ) y la capacidad total de lecho ( $q_{s1}$ ). Con todos estos datos y el flujo de líquido que se pasa por la columna para lograr la producción deseada se puede proceder al diseño de la columna.

Así, los datos obtenidos en el laboratorio son los siguientes:

$$L_1 = 42 \text{ cm}$$

$$FLU_1 = 0.9$$

$$L_{UNB1} = (1 - FLU_1) \cdot L_1 = 4.2 \text{ cm} \quad \text{Ecuación 15.2.1}$$

$$L_{b1} = 46.2 \text{ cm}$$

$$t_{b1} = 65.5 \text{ min}$$

$$t_{s1} = \frac{t_{b1}}{FLU_1} = \frac{65.5 \text{ minutos}}{0.9} = 72.78 \text{ minutos} \quad \text{Ecuación 15.2.2}$$

Los datos de  $q_{b1}$  y de  $q_{s1}$  se obtienen a partir de las siguientes fórmulas:

$$F_A = \frac{u \cdot C_0 \cdot \bar{M}}{\rho_b \cdot L} \quad \text{Ecuación 15.2.3}$$

$$q_b = F_A \cdot t_b \quad \text{Ecuación 15.2.4}$$

$$q_s = F_A \cdot t^* \quad \text{Ecuación 15.2.5}$$

Donde  $u$  es la velocidad de circulación del fluido a través de la torre (cm/s),  $C_0$  es la concentración de ectoína en la disolución a la entrada (mol/cm<sup>3</sup>),  $\bar{M}$  es la masa molar de la ectoína (g<sub>sóluto</sub>/mol),  $\rho_b$  es la densidad de la resina (g<sub>ads</sub>/cm<sup>3</sup>) y  $L$  la longitud de lecho (cm). Así:

$$F_{A1} = \frac{0.17 \frac{\text{cm}}{\text{s}} \cdot 0.03 \frac{\text{mol}}{\text{cm}^3} \cdot 142.16 \frac{\text{g ectoína}}{\text{mol ectoína}}}{0.8 \frac{\text{g resina}}{\text{cm}^3 \text{ resina}} \cdot 42 \text{ cm}} = 0.022 \frac{\text{g soluto}}{\text{g adsorbente} \cdot \text{s}}$$

Con esto hallamos  $q_{b1}$  y  $q_{s1}$ , ya que conocemos  $t_{b1}$  y  $t_{s1}$  se puede obtener a partir de la [Ecuación 15.2.2](#).

$$q_{b1} = F_{A1} \cdot t_{b1} = 0.022 \frac{\text{g soluto}}{\text{g adsorbente} \cdot \text{s}} \cdot 65.5 \text{ min} \cdot \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} = 86.46 \frac{\text{g soluto}}{\text{g adsorbente}}$$

$$q_{s1} = F_A \cdot t_1^* = 0.022 \frac{\text{g soluto}}{\text{g adsorbente} \cdot \text{s}} \cdot 72.78 \text{ min} \cdot \frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}} = 96.07 \frac{\text{g soluto}}{\text{g adsorbente}}$$

Aplicando el cambio de escala se obtiene que:

$$L_{UNB1} = L_{UNB2} = cte$$

$$q_{s1} = q_{s2} = cte$$

Conociendo estos datos, escogemos un nuevo punto de ruptura ( $t_{b2}$ ), y con ello podemos calcular  $L_2$  a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{L_1 - L_{UNB1}}{t_{b1}} = \frac{L_2 - L_{UNB2}}{t_{b2}} \quad \text{Ecuación 15.2.6}$$

Así, con  $L_2 = 76$  cm, que es un valor típico en este tipo de columnas, podemos hallar  $t_{b2} = 124.42$  min = 2.07 h, siendo esto el tiempo de rotura de nuestra columna.

Conocido  $L_2$  podemos calcular  $FLU_2$  a partir de la siguiente expresión:

$$FLU_2 = \frac{L_2 - L_{UNB2}}{L_2} = \frac{76 \text{ cm} - 4.2 \text{ cm}}{76 \text{ cm}} = 0.945 \quad \text{Ecuación 15.2.7}$$

Y una vez conocido este valor podemos calcular el  $q_{b2}$  a partir de la siguiente ecuación:

$$q_{b2} = q_{s2} \cdot FLU_2 = 96.07 \cdot 0.945 = 90.79 \quad \text{Ecuación 15.2.8}$$

Y ya para calcular  $t_{s2}$  lo obtenemos a partir de:

$$\begin{aligned} t_{s2} &= \frac{t_{b2}}{FLU_2} = t_{b2} + (t_{s1} - t_{b1}) = 124.42 + (72.78 - 65.5) \\ &= 131.7 \text{ min} \quad \text{Ecuación 15.2.9} \end{aligned}$$

Así, obtenemos que el paso de la disolución de agua con ectoína nos lleva un tiempo total de 124.42 min, lo que equivale a 2.07 h.

Ahora hemos de calcular el tiempo que nos lleva regenerar y lavar la columna, teniendo en cuenta que hay que pasar 6 veces el volumen de lecho de la disolución de NaOH 1.3 M y 1.7 veces el volumen de lecho de disolución de  $H_2SO_4$ . Para ello primero hemos de tomar un diámetro de columna lógico en cuanto a la relación L/D y que, a su vez, no nos haga trabajar con una gran cantidad de columnas en paralelo. Así tomaremos un L/D=2.5, lo que nos da un diámetro de 25.3 cm, obteniendo un flujo de:

$$\begin{aligned} Q &= 0.059 \frac{\text{cm}}{\text{s}} \cdot \pi \cdot \frac{(30.4 \text{ cm})^2}{4} = 42.82 \frac{\text{cm}^3}{\text{s}} = 2.57 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{minuto}} \\ V_{lecho} &= \pi \cdot \frac{(0.304 \text{ m})^2}{4} \cdot 0.76 \text{ m} = 0.055 \text{ m}^3 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que el volumen que hay que pasar de cada disolución, el tiempo que nos lleva es de:

$$t_{disolución_{NaOH}} = \frac{(6 \cdot 0.055) \text{ m}^3}{2.57 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{minuto}}} = 128.4 \text{ min}$$

$$t_{disolución_{NaOH}} = \frac{(1.7 \cdot 0.055) m^3}{2.57 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{minuto}} = 36.38 \text{ min}$$

$$t_{disolución_{NaOH}} = \frac{(1.7 \cdot 0.055) m^3}{2.57 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{minuto}} = 36.38 \text{ min}$$

Así, el tiempo total que nos lleva la regeneración es de 201.16 min, lo que equivale a 3.35 h, por lo que el tiempo de operación cada vez que utilizas la columna es 325.58 min, o lo que es lo mismo, 5.43 h. A todos los tiempos hay que sumarle el tiempo de paso, que es el siguiente:

$$t_{paso} = \frac{L_{columnas}}{v_{paso}} = \frac{152 \text{ cm}}{0.06 \text{ cm/s}} = 0.7 \text{ h}$$

Conocido esto, podemos disponer el tiempo que vamos a tardar en hacer pasar nuestra disolución de agua con ectoína. Teniendo en cuenta que nuestras columnas pueden operar en torno a dos horas adsorbiendo ectoínas hasta que se sature, y hemos de producir 20 kg ectoína/año, nuestra planta debe tratar 1712.3 L disolución/h, para lo cual trabajaremos con 12 columnas de intercambio iónico, agrupadas de dos en dos en serie y en paralelo con respecto a las otras, pudiendo así calcular el tiempo que nos lleva tratar la disolución:

$$\frac{1630.9 \frac{L}{h}}{6 \text{ columnas}} = 271.8 \frac{L}{h} \text{ tiene que tratar cada columna en serie}$$

Teniendo en cuenta que cada columna tiene una capacidad de tratar 154.2 L/h de disolución, necesita 1.85 h para tratar esa cantidad. Así, teniendo en cuenta el tiempo de tratamiento y el tiempo de paso, cada columna trata la disolución de agua+ectoína en 2.55 h, que, sumadas al tiempo de elución, lavado y tratamiento, obtenemos un tiempo total de 8 h exactas, que es lo que dura el turno de operación.

Por lo tanto, con nuestro diseño en discontinuo, nos daría tiempo a operar 1 única vez diaria con nuestras columnas en un turno, que es con el que vamos a trabajar.

Conocido esto podemos pasar a calcular la caída de presión en nuestra columna a partir de la ecuación de Ergun:

$$\frac{-\Delta P}{L} = 150 \cdot \frac{(1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3} \cdot \frac{\mu \cdot u_s}{D_p^2} + 1.75 \cdot \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon^3} \cdot \frac{\rho \cdot u_s^2}{D_p} \quad \text{Ecuación 15.2.10}$$

Donde L es la longitud del lecho, en nuestro caso 0.0076 m,  $\varepsilon$  es la porosidad de nuestro lecho, en nuestro caso 0.35 (Núñez et al., 2001),  $\mu$  es la viscosidad del fluido, que tomaremos la del agua en todos los casos, siendo  $10^{-3}$  Pa·s,  $D_p$  es el diámetro de la partícula del lecho poroso, en este caso 0.0011 m,  $\rho$  es la densidad, que también tomaremos la del agua,  $1000 \text{ kg/m}^3$ , y  $u_s$  la velocidad del fluido,  $0.00059 \text{ m/s}$ . Con todo ello, la caída de presión en nuestra columna es de:

$$\begin{aligned} \frac{-\Delta P}{L} &= 150 \cdot \frac{(1 - 0.35)^2}{0.35^3} \cdot \frac{10^{-3} \cdot 0.00059}{0.0011^2} + 1.75 \cdot \frac{(1 - 0.35)}{0.35^3} \cdot \frac{1000 \cdot 0.00059^2}{0.0011} \\ &= 729.14 \frac{Pa}{m} = 7.3 \cdot 10^{-3} \frac{bar}{m} \end{aligned}$$

Así, en nuestra columna de 0.76 m, la caída de presión es de 0.0055 bar.

#### 14.2.2. BOMBA DE IMPULSIÓN.

##### ELEVACIÓN DEL RECIPIENTE AGUAS ARRIBA.

Para realizar el diseño de la bomba supondremos un valor típico de NPSHr (1.5 m) y un factor de seguridad de 0.6 m (SF). Para los cálculos necesitamos la presión de operación del recipiente que se encuentra aguas arriba y también su nivel mínimo de líquido (LLL), además de la presión de vapor del líquido que llega a la bomba y su densidad. En nuestro caso tomaremos el líquido más restrictivo, ya que a través de nuestra bomba pasan hasta cuatro líquidos de diferentes propiedades.

También supondremos que la caída de presión en la succión es de 0.25 bar ( $\Delta P_{rated\text{succión}}$ ), sumando esto a la suposición de que la bomba está 0.9 m elevada respecto al nivel del suelo ( $CL_{bomba}$ ). Todo esto son valores típicos en este tipo de diseños.

Con estos valores podemos calcular ahora la elevación necesaria del recipiente previo, en este caso la columna de intercambio iónico C-211, utilizando la ecuación de Bernoulli en la línea de succión:

$$Z_{recipiente} = NPSHa - \left( \frac{P_{op\text{columna}}}{\rho \cdot g} + LLL - \frac{\Delta P_{rated\text{succión}}}{\rho \cdot g} \right) - \frac{P_{vapor}}{\rho \cdot g} - CL_{bomba} \quad \text{Ecuación 15.2.11}$$

$$NPSHa = NPSHr + SF \quad \text{Ecuación 15.2.12}$$

<b>P-103</b>		
NPSHa-Elevation		
NPSHr	1.5	m
FS	0.6	m
NPSHa	2.1	m
Pop columna	1	barg
LLL	0.76	m
deltaPrat-suc	1.05	bar
densidad	1000	kg/m3
Pv	0	barg
CLbomba	0.9	m
Z (columna)	1.2	m

Tabla 12. Datos referentes a la bomba P-212.

PRESIÓN DE SUCCIÓN Y DE DESCARGA:

Para calcular la presión de succión a caudal rated aplicamos el teorema de Bernoulli a la línea de succión:

$$P_{suc_{rated}} = P_{columna} + (z_{columna} + \left( \frac{(HLL + LLL)_{columna}}{2} - CL_{bomba} \right) \cdot \frac{\rho \cdot g}{100000} - \Delta Prated_{succión} \quad \text{Ecuación 15.2.13}$$

Para calcular la presión de succión a flujo mínimo y flujo normal, usamos la misma expresión cambiando el valor de la caída de presión en la succión:

$$P_{suc_{normal}} = P_{columna} + (z_{columna} + \left( \frac{(HLL + LLL)_{columna}}{2} - CL_{bomba} \right) \cdot \frac{\rho \cdot g}{100000} - \Delta Prated_{succión} \cdot \left( \frac{1}{1.2} \right)^2 \quad \text{Ecuación 15.2.14}$$

Siendo 1.2 el factor de sobrediseño.

$$P_{suc_{mín}} = P_{columna} + (z_{columna} + \left( \frac{(HLL + LLL)_{columna}}{2} - CL_{bomba} \right) \cdot \frac{\rho \cdot g}{100000} - \Delta Prated_{succión} \left( \frac{0.75}{1.2} \right)^2 \quad \text{Ecuación 15.2.15}$$

Siendo 0.75 el factor de turndown.

Conocido esto podemos calcular el valor de las presiones de descarga.

Para esto también necesitamos conocer la elevación del equipo que se encuentra aguas abajo para poder calcular la caída de presión debido a la diferencia de altura. También necesitamos la caída de presión en la propia tubería de descarga (tomaremos 0.15 bar como valor típico. En este caso, la línea de descarga también presenta una válvula, cuyo valor típico de caída de presión es de 0.7 bar.

La caída de presión debida a la altura ( $\Delta PH$ ) se calcula a partir de la siguiente expresión, conocida ya la elevación de la columna:

$$\Delta PH = \frac{((Z_C - CL_{bomba}) \cdot \rho g)}{100000} \quad \text{Ecuación 15.2.16}$$

Así, la caída de la presión total es la suma de todas las caídas, lo transformamos a metros y la llamamos  $\Delta PH_{total}$ .

También tenemos que calcular la  $\Delta PH_{normal}$  y  $\Delta PH_{mínima}$ , las cuales se calculan a partir de multiplicar la  $\Delta PH_{total}$  calculada previamente por 1.07 y 1.17 respectivamente (valores típicos). Con estos valores calculamos las presiones de descarga:

$$P_{descarga_{rated}} = P_{suc_{rated}} + \Delta PH_{total} \quad \text{Ecuación 15.2.17}$$

$$P_{descarga_{normal}} = P_{suc_{normal}} + \Delta PH_{normal} \quad \text{Ecuación 15.2.18}$$

$$P_{descarga_{mínimo}} = P_{suc_{min}} + \Delta PH_{min} \quad \text{Ecuación 15.2.19}$$

deltaP bomba		
deltaP válvula	0.7	bar
deltaP línea	0.15	bar
deltaPH	0.21	bar
deltaPtot	1.06	bar
delHtot	10.8	m
Psuc-rat	0.28	barg
Pdes-rat	1.34	barg
Psuc-norm	0.34	barg
deltaP-norm	1.13	bar
Pdes-norm	1.47	barg
Psuc-min	0.50	barg
deltaP-min	1.2	barg
Pdes-min	1.74	barg

Tabla 13. Datos referentes a la bomba P-212.

#### MÁXIMA PRESIÓN DE SUCCIÓN.

La máxima presión de succión se calcula aplicando el balance de Bernoulli en la línea de succión cuando no hay flujo, por lo que no hay caída de presión en la tubería. Aquí consideramos el máximo nivel en el recipiente y la presión de diseño en el equipo de aguas arriba para hacer el cálculo lo más restrictivo posible.

$$P_{suc_{máxima}} = P_{d_{columna}} + (z_{columna} + HLL - CL_{bomba}) \cdot \frac{\rho g}{100000} \quad \text{Ecuación 15.2.20}$$

Para calcular la presión de shutoff, necesitamos conocer la  $\Delta PH_{shutoff}$ , que la consideraremos como 1.25 veces la de  $\Delta PH_{total}$ .

Así, la presión de shutoff se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$P_{shutoff} = P_{suc_{máx}} + \Delta PH_{shutoff} \quad \text{Ecuación 15.2.21}$$

Shutoff		
Pdcolumna	3.50	barg
HLL	1.58	m
Max P suc	4.08	barg
deltaPshutoff	13.47	m
deltaPshutoff	1.32	bar
Pshutoff	5.40	barg

Tabla 14. Datos referentes a la bomba P-212..

#### CABEZAL DE LA BOMBA.

Se calcula como la diferencia entre las presiones de succión y descarga para el caudal mínimo, normal y rated. El resultado se da en metros y se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$h = \frac{(P_{descarga} - P_{succión}) \cdot 100000}{\rho g} \quad \text{Ecuación 15.2.22}$$

	Mínimo	Normal	Rated
Diferencia de presión (bar)	1.23	1.13	1.05
Cabezal de la bomba (m)	12.55	11.53	10.71

Tabla 15. Comparación de diferencias de presión y cabezales a diferentes caudales.

#### POTENCIA HIDRAÚLICA.

$$P_H = Q_{rated} \cdot \rho g \cdot h = 17.7 \text{ kW} \quad \text{Ecuación 15.2.23}$$

Utilizamos el flujo rated porque es como conseguimos la máxima potencia requerida por la bomba.

h es el cabezal calculado previamente.

#### 14.2.3. TANQUE DE ALMACENAMIENTO

El diseño de los tanques debe ir relacionado con el de las bombas, ya que la elevación de los mismos depende de la bomba que tiene a continuación.

Para el diseño de estos tanques necesitamos conocer el flujo de líquido que entra y su densidad, en este caso, si nos centramos en el V-126:

Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1000
Flujo (dm <sup>3</sup> /min)	28.53

Tabla 16. Características del flujo que entra en el tanque a diseñar.

Para este tipo de tanques, consideramos los siguientes valores de tiempos de diseño, que son los típicos utilizados en estos casos:

BTT-LLL	3	min
LLL-NLL	20	min
NLL-HLL	8	min
HHLL-HLL	1	min

Tabla 17. Tiempos típicos utilizados en el diseño de tanques.

También consideraremos una relación L/D de 2.5, también común en este tipo de diseños. Con el caudal que entra al tanque y los tiempos previamente mencionados podemos calcular las diferentes alturas a partir de la siguiente expresión:

$$h_i = \frac{Q \cdot t_i}{A} \quad \text{Ecuación 15.2.42}$$

Consideraremos que la distancia entre el HHLL y la altura máxima del tanque sea de 1 m, siendo este también un valor típico.

Así, se resuelve el sistema para despejar las incógnitas, como son el D y la h, pudiendo así calcular el volumen del tanque.

BTT-LLL	1.82	dm
LLL-NLL	12.1	dm
NLL-HLL	4.84	dm
HHLL-HLL	0.61	dm
h total	29.37	dm
D	7.74	dm

Tabla 18. Dimensiones del tanque de almacenamiento V-204.

### 14.3. ANEXO 3: BALANCE DE MATERIA.

Nuestro objetivo es producir 20 kg/año de ectoína, para lo cual, según los resultados obtenidos en el laboratorio, deben entrar al proceso de purificación al menos 23.53 kg/año, ya que se pierden el resto de kilogramos durante el proceso de purificación.

#### CORRIENTE DE SALIDA DEL BIORREACTOR.

Según los resultados obtenidos en el laboratorio, la concentración de biomasa en el medio salino con la que se estaba trabajando es de 41.83 g biomasa húmeda/L medio salino, y la cantidad de ectoína por cada gramo de dicha biomasa es de 5 mg ectoína/g biomasa húmeda, por lo que hay 209.15 mg ectoína/L medio. Así, considerando que la planta opera 365 días al año 8 horas diarias, de las cuales alrededor de 6 son para regenerar la columna, por lo tanto, la corriente de salida del biorreactor presenta las siguientes características:

	Concentración de biomasa	Concentración de ectoína	Volumen de flujo
<b>Corriente 1</b>	41.83 g biomasa húmeda/L	209.15 mg ectoína/L	154.1 L medio/h

Tabla 19. Características de la corriente de salida del biorreactor V-101.

#### CORRIENTE DE SALIDA DE LA CENTRÍFUGA POR PRIMERA VEZ.

En la centrífuga lo que hacemos es separar la biomasa del medio salino para recuperar la biomasa, por lo que las corrientes de salida son las mismas que en el caso de la corriente de salida del biorreactor, solo que escindida en dos corrientes, una en la que se irá el medio salino, que se desecha, y otra por la que circularía la biomasa, de la cual todavía no ha sido obtenida la ectoína, que se lleva al tanque de bio-milking.

	<b>Cantidad de biomasa</b>	<b>Cantidad de ectoína</b>
<b>Corriente 2</b>	6446.41 g biomasa húmeda/h	32232.07 mg ectoína/h

Tabla 20. Características de la corriente de salida de la centrífuga V-104.

#### CORRIENTE DE SALIDA DEL TANQUE DE BIO-MILKING.

Con el estudio de laboratorio, se determinó que la cantidad ideal de agua era de 0.25 L de agua por cada gramo de biomasa húmeda. Por ello, se adicionan 26.24 L agua /h, siendo las cantidades de ectoína y de biomasa las mismas que en las anteriores corrientes:

	<b>Concentración de biomasa</b>	<b>Concentración de ectoína</b>	<b>Volumen de flujo</b>
<b>Corriente 3</b>	4 g biomasa/L	20 mg ectoína/L	1611.6 L /h

Tabla 21. Características de la corriente de salida del tanque de bio-milking V-105.

#### CORRIENTE DE SALIDA DE LA CENTRÍFUGA POR SEGUNDA VEZ.

Al ser un proceso discontinuo, se nos permite volver a utilizar la misma centrífuga que para separar la primera biomasa. Así, lo único que se hace en esta etapa es separar nuevamente la biomasa de la disolución de la ectoína una vez que esta la ha liberado. Así la corriente 4 presenta las siguientes concentraciones:

	<b>Concentración de ectoína</b>	<b>Volumen de flujo</b>
<b>Corriente 4</b>	20 mg ectoína/L	1611.6 L /h

Tabla 22. Características de la corriente de salida de la centrífuga V-104.

La biomasa se devuelve al biorreactor.

#### CORRIENTE DE SALIDA DE LA ELECTRODIÁLISIS.

En esta etapa se pierde una parte de la ectoína, como se ha comprobado en el estudio experimental, por lo que esta corriente presenta las siguientes características:

	<b>Concentración de ectoína</b>	<b>Volumen de flujo</b>
<b>Corriente 6</b>	18.09 mg ectoína/L	1611.6 L /h

Tabla 23. Características de la corriente de salida de la electrodiálisis V-201.

#### CORRIENTE DE SALIDA DE LAS COLUMNAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Tras el paso de la disolución de agua por la columna, la ectoína queda retenida en la resina, por lo que a continuación se hace circular una disolución de NaOH 1.3 M que recoge dicha ectoína, por lo que esta corriente presenta las siguientes características:

	Concentración de ectoína	Volumen de flujo
<b>Corriente 10</b>	84.98 mg ectoína/L	330 L NaOH/h

Tabla 24. Características de la corriente de salida de las columnas de intercambio iónico C-213.

En los ensayos de laboratorio también se ha podido apreciar que una parte de la ectoína se pierde en esta etapa.

#### CORRIENTE DE SALIDA DEL PRIMER EVAPORADOR.

En esta parte del proceso se elimina gran parte de la disolución de NaOH con el objetivo de lograr una concentración al 95 % w/w de ectoína, por lo que las características de esta corriente son que hay un flujo de ectoína 28041.9 mg ectoína/h, manteniendo una parte de la disolución sin evaporar.

#### CORRIENTE DE SALIDA DEL TANQUE DE ADICIÓN DE METANOL.

En este tanque se adicionan 10 kg de metanol por cada kg de ectoína en la corriente, por lo que en esta corriente se obtienen los siguientes valores teniendo en cuenta que se recupera el 90% de metanol gracias al ciclo de condensación:

	Concentración de ectoína	Volumen de flujo (metanol)
<b>Corriente 16</b>	79200 mg ectoína/L	0.035 L metanol/h

Tabla 25. Características de la corriente de salida del cristizador V-309.

#### CORRIENTE DE SALIDA DEL FILTRO.

En el filtrado del precipitado que se forma mediante la adición de metanol ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) se pierde un 2% de ectoína respecto al paso previo, por lo que las características de esta corriente son:

	Concentración de ectoína	Volumen de flujo (metanol)
<b>Corriente 17</b>	77379.31 mg ectoína/L	0.38 L metanol/h

Tabla 26. Características de la corriente de salida del filtro F-306.

CORRIENTE DE SALIDA DEL CRISTALIZADOR.

Finalmente, del cristalizador obtenemos únicamente la ectoína, con una producción de 27397.26 mg/h.

A continuación, se muestra una tabla general con los principales datos de todas las corrientes:

CORRIENTE	[Ectoína] (ppm)	ST (g/kg corriente)	SV (g/kg ST)	Flujo (L/h)
1	-	72.89	3.17	154.11
2	-	107.09	38.4	-
3	20	-	-	1611.6
4	20	0.34	0.12	1611.6
5	-	-	-	1611.6
6	-	-	-	-
7	18.09	0.04	0.04	1611.6
8	-	-	-	330
9	-	-	-	93.5
10	-	-	-	93.5
11	84.98	-	-	330
12	-	-	-	0.99
13	84.98	59.52	9.49	330.99
14	-	-	-	0.69
15	-	-	-	0.035
16	79200	-	-	0.35
17	77379.3	-	-	0.35
18	-	931.07	26.63	-
19	-	931.07	26.63	-

Tabla 27. Resumen de las características de las corrientes.