



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE 2,3-BUTANODIOL A PARTIR DE DESTRÍO DE ZANAHORIA MEDIANTE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS

Autor:

Pérez Verdejo, César

Tutores:

García Cubero, María Teresa

López Linares, Juan Carlos

Dpto. Ingeniería Química Y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, mayo de 2024









RESUMEN

En este trabajo se ha dimensionado un biorreactor continuo de tanque agitado, a escala pilotolaboratorio, para producir 2,3-butanodiol mediante sacarificación y fermentación simultánea, SSF, a partir de destrío de zanahoria utilizando *Paenibacillus polymyxa*.

Se ha analizado el proceso SSF para determinar los parámetros de operación en cuanto a carga de enzimas (5 FPU/g), tipo de agitador y velocidad de agitación (turbina de disco, 50 rpm) y necesidades de aeración (0,2 vvm).

A partir de los resultados experimentales, se ha dimensionado dicho biorreactor fabricado en acero inoxidable AC316, con un volumen útil de fermentación de 0,202 m³ (diámetro 0,635 m, altura 0,953 m). El sistema de agitación consiste en dos turbinas de disco con seis álabes cada una de ellas y un diámetro del impulsor de 0,212 m. El biorreactor se encuentra encamisado, siendo necesaria una superficie de intercambio de calor de 0,149 m².

Finalmente, se han evaluado sus emisiones de dióxido de carbono y se ha calculado su coste económico, que ascendería a 25342,79 euros.

Palabras clave: sacarificación, fermentación, 2,3-butanodiol, Paeniliacillus polymyxa, balance de materia, nivel térmico.

ABSTRACT

In this work, a continuous stirred tank bioreactor, at pilot-laboratory scale, has been dimensioned to produce 2,3-butanediol by simultaneous saccharification and fermentation, SSF, from carrot detritus using *Paenibacillus polymyxa*.

The SSF process was analyzed to determine the operating parameters in terms of enzyme loading (5 FPU/g), stirrer type and stirring speed (disc turbine, 50 rpm) and aeration requirement (0,2 vvm).

Based on the experimental results, this bioreactor made of AC316 stainless steel, with a useful fermentation volume of 0,202 m3 (diameter 0,635 m, height 0,953 m), has been dimensioned. The agitation system consists of two disc turbines with six blades each and an impeller diameter of 0,212 m. The bioreactor is encapsulated in a stainless steel tank. The bioreactor is jacketed, requiring a heat exchange surface of 0,149 m2.

Finally, its carbon dioxide emissions have been evaluated and its economic cost has been calculated, which would amount to 25342,79 euros.

Keywords: saccharification, fermentation, 2,3-butanediol, *Paeniliacillus polymyxa*, material balance, thermal level.







Universidad de Valladolid



Índice.

1.		Introducción6				
	1.1	1.	Prod	lucción de frutas y verduras y sus residuos	6	
	1.2	2.	Zana	ahoria	.11	
		1.2.2	1.	Composición de la zanahoria	.12	
		1.2.2	2.	Aplicaciones y beneficios de la zanahoria	.13	
	1.3	3.	2,3-l	Butanodiol	.14	
		1.3.2	1.	Aplicaciones del 2,3-butanodiol.	.15	
		1.3.2	2.	Vías de obtención del 2,3-butanodiol	.15	
	1.4	4.	Obte	ención del 2,3-Butanodiol mediante procesos de fermentación. Diagrama de		
	blo	oque	s		.19	
		1.4.3	1.	Etapa de hidrólisis enzimática (sacarificación)	.20	
		1.4.2	2.	Etapa de fermentación	.22	
		1.4.3	3.	SSF, como alternativa de intensificación de procesos	.25	
2.		Obje	etivos		.26	
3.		Mat	eriale	es y métodos	.27	
	3.:	1.	Mat	eria prima	.27	
	3.2	2.	Hidr	ólisis enzimática	.27	
	3.3	3.	Fern	nentación (microorganismo, medio de cultivo, medio de fermentación)	.27	
	3.4	4.	Mét	odos analíticos	.29	
	3.5	5.	Ensa	iyos realizados	.29	
		3.5.2	1.	Obtención de datos cinéticos.	.30	
		3.5.2	2.	Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno	.30	
		3.5.3	3.	Ensayos SSF en BDTA	.31	
4.		Resu	ultado	DS	.32	
	4.2	1.	Obte	ención de datos cinéticos (ensayos en los erlenmeyers e incubador orbital)	.32	
	4.2	2.	Cálc	ulo del coeficiente de transporte de oxígeno	.35	
	4.3	3.	Ensa	iyos SSF en BDTA	.38	
		4.3.2	1.	Influencia del tipo de agitador	.38	
		4.3.2	2.	Influencia de la carga de enzimas	.40	
		4.3.3	3.	Influencia de la aeración	.42	
5.		Dise	ño de	e un biorreactor para el proceso de SSF	.46	
	5.2	1.	Bala	nce de materia a las células	.47	
	5.2	2.	Bala	nce de materia al producto	.48	





	5.3.	Cálc	ulo de las dimensiones del reactor49
	5.4.	Nec	esidades de potencia para la agitación del sistema52
	5.4.	1.	Potencia del sistema de agitación sin aeración52
	5.4.	2.	Potencia del sistema de agitación con aeración53
	5.5.	Nive	el térmico55
6.	Imp	acto	ambiental
7.	Estu	udio e	económico61
	7.1.	Cost	te económico del equipo61
	7.2.	Cost	te económico de ingeniería62
	7.3.	Cost	te económico total62
8.	Con	clusio	ones63
9.	Bibl	liogra	fía65
1(). Ane	exos.	
	10.1.	Р	rocedimiento llevado a cabo para la obtención de los datos cinéticos68
	10.2. transp	P orte	rocedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el cálculo del coeficiente de de oxígeno71
	10.3.	Р	rocedimiento llevado a cabo en el laboratorio en cada ensayo SSF en BDTA72
	10.3 con	3.1. centr	SSF en BDTA de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL a una ación enzimática de 5 FPU/g y dos palas diferentes (hélice y turbina de disco)72
	10.3 con	3.2. centr	SSF en BDTA de 2 L con un volumen de trabajo de 700 mL a dos aciones enzimáticas diferentes 5 FPU/g y 10 FPU/g74
	10.3	3.3.	SSF en BDTA de 2 L con un volumen de trabajo de 700 mL y aeración77
	10.4.	Т	ablas experimentales81





1. Introducción.

La producción de 2,3-butanodiol se ha llevado a cabo, de manera habitual, partiendo del petróleo como materia prima, realizando un craqueo de éste para obtener cadenas de hidrocarburos de cuatro átomos de carbono, que se hidrolizan a altas presiones y temperaturas, sin embargo al ser una fuente no renovable y debido a su gran uso y a la gran multitud de aplicaciones en las que interviene hace que sea un recurso que presenta un rápido agotamiento, además su encarecimiento y los problemas medioambientales que puede causar han hecho que se hayan buscado procesos alternativos para la obtención del 2,3-butanodiol como son las fermentaciones con microorganismos.

La sacarificación y fermentación simultánea de la zanahoria se trata de un proceso más sostenible mediante el que se puede obtener 2,3-butanodiol de una forma menos contaminante y más económica, puesto que la materia prima (zanahoria) es más barata, y con unas condiciones del proceso mucho menos extremas, además de este producto se obtienen otros subproductos que también son de interés, es el caso de acetoína, etanol, ácido acético y ácido galacturónico.

Existen multitud de microorganismos capaces de producir de forma natural 2,3-butanodiol. La concentración final obtenida de 2,3-butanodiol depende en gran medida del microorganismo empleado en la fermentación. Algunos de ellos son: *Paenibacillus polymyxa, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Bacilus subtilis, Bacilus licheniformis*, etc.

1.1. Producción de frutas y verduras y sus residuos.

Los desechos de frutas y verduras son ricos en material orgánico, este hecho hace que en los últimos años se hayan desarrollado procesos de valorización de estos residuos con el objetivo de aprovecharlos, transformándolos en biocombustibles, energía, abonos, fertilizantes o compuestos químicos de alto interés industrial, comercial y/o económico, como es el caso del 2,3-butanodiol [1].

• Producción mundial

De acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [2], la producción mundial de frutas y verduras en el año 2020 se situó en torno a los 2.035 millones de toneladas anuales, como se puede ver en la Figura 1.



ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad deValladolid



Figura 1: Distribución de la producción mundial de frutas y hortalizas [2].

La mayor producción de frutas y hortalizas pertenece a China, con casi 1.000 millones de toneladas anuales, seguido muy de lejos por la India con 245 millones de toneladas, por detrás se encuentra el continente europeo con 200 millones de toneladas anuales.

El IPA de la FAO, asegura en su publicación de 2019 que se desecha aproximadamente el 13,8% de la producción agrícola mundial, desde su explotación agrícola hasta su venta al por menor, pero sin incluir ésta [3]. En la siguiente gráfica se puede observar claramente esta afirmación.



Figura 2: Desperdicio mundial de frutas y hortalizas desde la explotación agrícola hasta su venta al por menor [3].

Como se puede ver en la figura anterior, los países situados en Asia central y meridional presentan un porcentaje de pérdidas de alimentos (frutas y hortalizas) superior al 21%, muy por encima de la media mundial. Les siguen los países de América septentrional y Europa con pérdidas de alrededor del 16%. En el lado opuesto se encuentran países como Australia y Nueva Zelanda donde sus pérdidas oscilan entre el 5% y el 6%.

Las pérdidas en la producción agrícola son mayores en Europa, América del Norte, Oceanía y América Latina, esto se debe principalmente a los estándares de calidad impuestos por los vendedores minoristas.





Los desechos generados en el procesamiento son superiores en África subsahariana, África del Norte y Asia, lo cual puede ser debido al deterioro de los cultivos perecederos en los países en vías de desarrollo.

Finalmente, el desperdicio en la etapa de consumo se ve claramente incrementado en los países desarrollados, con mayor nivel económico, como pueden ser los países europeos, América del Norte, Oceanía y la parte de Asia industrializada [3].

• Producción en Europa

En la Unión Europea, el valor de la producción de frutas y hortalizas se ha incrementado un 7% en 2021 frente al estudio anterior que comprendía del año 2016 al 2020, tal y como se puede ver en la siguiente imagen (Figura 3) [2].



Figura 3: Valor de la producción de frutas y hortalizas en varios países de la UE [2].

España, con 15.470 millones de euros en 2021, supone el 21% del valor total de la producción de la Unión Europea, seguido de países como Italia con un 17% y Francia con un 14%.

La distribución de la producción de frutas y hortalizas en nuestro continente queda de la siguiente forma [2]:



Figura 4: Distribución de la producción de frutas y hortalizas en la UE [2].





Como se puede ver en la gráfica anterior, los principales países productores de frutas y hortalizas en la Unión Europea son España e Italia, entre ambos países suman casi el 50% de la producción de todo el continente.

En cuanto a las importaciones y exportaciones de frutas y hortalizas, el continente europeo es un continente importador. En el 2021 se exportaron al resto del mundo 10.409 millones de toneladas anuales que supuso 11.575 millones de euros, sin embargo se importaron la friolera de 19.024 millones de toneladas, lo que se tradujo en 24.546 millones de euros [2].

Con el paso de los años, el coste económico de las exportaciones se ha mantenido, mientras que el gasto en las importaciones ha ido aumentando, lo que ha provocado un saldo comercial negativo y mayor año tras año, como se puede ver en la siguiente gráfica (Figura 5).



Saldo comercial EU 27 vs TTPP (millones €)

En lo referente a los desperdicios generados en nuestro continente, según un estudio realizado por el Centro Común de Investigación de la Unión Europea, los consumidores europeos desperdician miles de millones de kilos de frutas y verduras al año, atendiendo a los datos, cada consumidor europeo genera alrededor de 35,3 kilos de desperdicios de frutas y verduras al año, lo que supone que se tiran anualmente 17.000 millones de kilos de estos alimentos frescos, esto es un 30% de la fruta y verdura que se compra [4].

Las razones de este desperdicio es una combinación de los elevados estándares de calidad que tienen los supermercados, unas estrictas regulaciones gubernamentales y las altas expectativas que los consumidores europeos tienen a la hora de comprar estos productos en cuanto a tamaño, forma y color.

Producción en España

En España, el valor de la producción de frutas y verduras también ha ido en aumento en la última década, hasta llegar en el 2021 a los 15.407 millones de euros, como ya se ha mencionado con anterioridad. En la siguiente imagen podemos ver dicha evolución, así como el valor económico de la producción de cada producto (frutas, hortalizas y patata) [2].

Figura 5: Comparación económica entre importaciones y exportaciones en los últimos años en la UE [2].







VALOR PRODUCCIÓN (millones €)

Figura 6: Valor de la producción de frutas, hortalizas y patas en España en los últimos años [2].

La distribución de la producción de frutas y hortalizas, por comunidades autónomas, queda repartida de la siguiente forma [2]:



Figura 7: Distribución de la producción de frutas y hortalizas en España en 2021 [2].

Claramente, se observa en el gráfico anterior que las zonas bañadas por el mar Mediterráneo son las que presentan una mayor producción, tales como Andalucía con un 34%, seguido de la Comunidad Valenciana (16%) y Murcia (13%).

En cuanto al capítulo de importaciones y exportaciones se puede asegurar, sin equivocarnos, que España es un país exportador. En el año 2021 de nuestro país se exportaron cerca de 14 millones de toneladas de frutas y verduras, obteniendo unas ganancias de 18.000 millones de euros, mientras que en cuanto a las importaciones, se introdujeron en nuestras fronteras apenas 4,5 millones de toneladas, lo que supuso un gasto de 4.969 millones de euros.



ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad deValladolid



Figura 8: Comparación económica entre importaciones y exportaciones en los últimos años en la UE [2].

Con el paso de los años el coste económico de las importaciones ha ido aumentando ligeramente, si bien es cierto, que los ingresos gracias a las exportaciones también han aumentado, por lo que el saldo comercial de España, al contrario de lo que ocurre en Europa, es muy positivo, tal y como se puede ver en la *Figura 8*.

A la hora de referirse a España, de los aproximadamente 200 millones de toneladas de frutas y hortalizas que se produjeron en el continente europeo, el 25% fueron de origen español, es decir unos 50 millones de toneladas. A nivel nacional, casi el 50% de los residuos que se generan provienen de frutas y verduras frescas.

1.2. Zanahoria.

La zanahoria pertenece a la familia de las umbelíferas, también conocidas como apiáceas. Es la hortaliza más importante y de mayor consumo dentro de las pertenecientes a esta familia. Esta planta es originaria de Eurasia y del norte de África y ampliamente distribuida por todas las regiones templadas del hemisferio norte.

Se trata de una planta bianual; durante los meses de otoño e invierno del primer año forma una roseta de hojas finamente divididas, y almacena nutrientes en su raíz napiforme, principalmente azúcares, que se vuelve grande y carnosa. El tallo floral crece alrededor de 10 cm con una umbela de flores blancas en su ápice. La raíz, que es la parte comestible suele ser de color naranja intenso y su tamaño suele alcanzar los 15 cm y los 90-100 gramos de peso.

Se puede encontrar zanahoria fresca en el mercado durante cualquier estación del año, si bien las de temporada son las que se cultivan a finales de la primavera. Éstas son pequeñas, dulces y muy tiernas, mientras que las de invierno son más gruesas y duras [5].







Figura 9: Imagen de las zanahorias.

1.2.1. Composición de la zanahoria.

La zanahoria es un elemento excelente desde el punto de vista nutricional gracias a su contenido en vitaminas y minerales. El agua es su componente más abundante con un porcentaje de casi el 89%, seguido a gran distancia de los hidratos de carbono con un 7,3%, que son nutrientes que aportan energía. La zanahoria, al tratarse de una raíz, absorbe los nutrientes y los asimila en forma de azúcares, fundamentalmente glucosa, celobiosa y fructosa [6]. Se puede destacar el valor de la glucosa que es aproximadamente el 41% del total de los azúcares y por otro lado, la celobiosa y la fructosa que representan un 33% y un 24% respectivamente. También existen otros carbohidratos, pero en mucha menor media como la arabinosa, que apenas representa el 1%. Estos carbohidratos son muy buenos sustratos para los procesos fermentativos como el que se trata en este proyecto. En la siguiente tabla se puede ver la composición en carbohidratos de la zanahoria:



Figura 10: Carbohidratos presentes en la zanahoria

Su color naranja se debe a la presencia de carotenos, entre ellos el β-caroteno, que se trata de un pigmento natural y antioxidante que el organismo transforma en vitamina A. Los carotenoides son tetraterpenos. Además, las zanahorias también presentan una cantidad muy pequeña de vitamina E y de vitaminas del grupo B. En cuanto a los minerales, destaca su gran contenido en potasio, el cual es de suma importancia para la transmisión del impulso nervioso, así como para la actividad muscular normal, además de intervenir en el equilibrio hídrico dentro y fuera de la célula. Desde un punto de vista nutricional, la zanahoria aporta 40 Kilocalorías por cada 100 gramos.





Todos estos datos se pueden observar en la Tabla 1 que se presenta a continuación [6]:

	Por 100 g de porción comestible
Energía (Kcal) Proteínas (g) Lípidos totales (g) AG saturados (g) AG monoinsaturados (g) AG poliinsaturados (g) ω^3 (g)* C18:2 Linoleico (ω -6) (g) Colesterol (mg/1000 kcal) Hidratos de carbono (g) Fibra (g) Agua (g)	40 0,9 0,2 0,037 0,014 0,117
Calcio (mg)	41
Hierro (mg)	0.7
Yodo (µg)	9
Magnesio (mg)	13
Zinc (mg)	0.3
Sodio (mg)	77
Potasio (mg)	255
Fósforo (mg)	37
Selenio (µg)	1
Tiamina (mg)	0,05
Riboflavina (mg)	0,04
Equivalentes niacina (mg)	0,6
Vitamina B _s (mg)	0,15
Folatos (µg)	10
Vitamina B ₁₂ (µg)	0
Vitamina C (mg)	6
Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	1.346
Vitamina D (µg)	0
Vitamina E (mg)	0,5

Tabla 1: Composición de la zanahoria.

1.2.2. Aplicaciones y beneficios de la zanahoria.

La zanahoria es el elemento más rico en β -caroteno, sustancia que tras ser absorbida en nuestro cuerpo se transforma en vitamina A, ésta es esencial para la visión. El 11-cis-retina, una forma activa de la vitamina A, se combina con una sustancia orgánica llamada opsina generando de esta forma un compuesto activo llamado rodopsina que se encuentra en la retina del ojo humano. Los rayos de luz de baja intensidad descomponen la rodopsina y mediante un conjunto de reacciones químicas excitan el nervio óptico originando estímulos visuales en el cerebro.

El β -caroteno, al igual que la vitamina E son sustancias antioxidantes y neutraliza y bloquean el efecto dañino de los radicales libres, por lo que el consumo frecuente de zanahorias ayuda a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, degenerativas y de cáncer.

La zanahoria también regula la función intestinal puesto que contiene un aceite esencial junto a cantidades importantes de pectinas (fibra soluble) lo que las confiere un elevado poder astringente. Si se ingiere cruda, su contenido en fibra insoluble favorece la función intestinal, lo que resulta beneficioso en caso de estreñimiento [7].





Durante el embarazo los requerimientos de yodo son muy importantes para el correcto funcionamiento de las hormonas tiroideas que intervienen en el crecimiento del feto, el desarrollo de su cerebro y en la regulación de otras funciones metabólicas como es el mantenimiento de la temperatura corporal. El aporte adecuado de vitamina A en los niños es imprescindible ya que contribuye al buen crecimiento y desarrollo óseo, además de proteger al organismo frente a las infecciones.

1.3. 2,3-Butanodiol.

El 2,3-Butanodiol es un compuesto orgánico incoloro, inodoro y que pertenece a la familia de los alcoholes. Suele encontrarse en estado líquido en condiciones estándar. Se trata de uno de los isómeros del butanodiol y se puede conocer por diferentes nombres: 2,3-butilen-glicol, dimetilen-glicol, dimetiletilen-glicol y según la UPAC se denomina como butano-2,3-diol.

Existen tres formas isoméricas del mismo: el isómero levógiro, el isómero dextrógiro y la forma meso (Figura 11). El 2,3-butanodiol tiene dos centros quirales lo que significa, como se ha comentado anteriormente, que presenta tres estereoisómeros, dos de los cuales son enantiómeros entre sí y ópticamente activos. La forma meso es la única que no presenta actividad óptica [8].



Figura 11: Estereoisómeros del 2,3-butanodiol [8].

Debido a la presencia de los grupos hidroxilo –OH, el 2,3-butanodiol es un compuesto polar, soluble en agua y en otros disolventes polares, como por ejemplo alcoholes o ésteres, también esta presencia de los dos grupos alcohol le otorga una gran higroscopicidad.

Se encuentra en la manteca del cacao y en las raíces de la planta *Ruta graveolens*. Algunas de sus propiedades físicas más significativas se pueden ver en la Tabla 2.

Fórmula	$C_4H_{10}O_2$
Densidad	1002 Kg/m ³
Masa molar	90,12 g/mol
Punto de fusión	18 °C
Punto de ebullición	180 °C (1013 hPa)
Punto de inflamabilidad	85 °C
Temperatura de ignición	395 °C

Tabla 2: Propiedades	físicas de	el 2,3-bu	tanodiol.





La producción mundial de 2,3-butanodiol asciende a 7400 toneladas anuales, con un coste de aproximadamente 1600 USD por tonelada [1].

1.3.1. Aplicaciones del 2,3-butanodiol.

Tradicionalmente el 2,3-butanodiol se ha utilizado en la industria química y en la de los combustibles, puesto que por su alto índice de octanos es útil como potenciador del octanaje de dichos combustibles, además el enantiómero (2R,3R)-2,3-butanodiol se emplea como anticongelante de gasolinas y querosenos debido a su bajo punto de fusión, sin embargo, el interés en este compuesto ha aumentado mucho en los últimos años debido al gran número de aplicaciones que tiene.

Por todos es sabido que el petróleo es una fuente de energía no renovable y limitada, y que por lo tanto los combustibles que deriven de él también lo son. Por ello una posible solución a este problema son los biocombustibles como por ejemplo el 2,3-butanodiol, siendo éste una alternativa más económica que el bioetanol.

En la industria química, el 2,3-butanodiol se utiliza como reactivo de análisis en cromatografía de gases, otra aplicación química es su transformación en 1,3-butadieno que sirve para fabricar goma sintética. Por otra parte, la deshidratación del 2,3-butanodiol da metil-etil-cetona, que se emplea como disolvente de resinas y lacas.

Este compuesto se ha abierto camino en otros sectores como el agrícola, el cosmético, el farmacéutico/médico y el alimentario.

En el sector alimentario, el diacetilo, que se obtiene tras la deshidrogenación del 2,3-butanodiol, se usa como agente saborizante, mientras que en medicina, de la esterificación de este compuesto con ácido málico se obtienen las poliuretano-melamidas adecuadas para aplicaciones cardiovasculares, también el 2,3-butanodiol se usa para la producción de vectores de fármacos y presenta propiedades antiinflamatorias. Se ha demostrado que el 2,3-butanodiol permite la eliminación de células hepáticas dañadas

En cuanto al sector cosmético, el 2,3-butanodiol se emplea en la fabricación de perfumes y suavizantes y en el sector agrícola se utiliza para la elaboración de agentes humectantes y fumigantes [9].

1.3.2. Vías de obtención del 2,3-butanodiol.

Existen dos métodos principales para la obtención de 2,3-butanodiol: una ruta química, a partir de fracciones de petróleo o una ruta bioquímica, mediante procesos de fermentación de azúcares. Ambos métodos se proceden a explicar a continuación.

• Ruta química:

La forma más común para llevar a cabo la producción industrial de butanodiol consiste en realizar el craqueo del crudo de petróleo para conseguir hidrocarburos de cuatros átomos de carbono, que se hidrolizan a altas presiones y temperaturas.





Tal y como se muestra en la Figura 12, se hace un craqueo inicial del crudo de petróleo, en el que se obtienen gases de craqueo entre los que se encuentra el butadieno (40-45% en masa) que se separa del refinado inicial mediante extracción con un disolvente.

A continuación, al refinado I, que es el producto obtenido tras la extracción con el disolvente, ya sin butadieno, se le añade metanol para que reaccione con el isobutileno presente, y se le somete a un nuevo proceso de extracción, de esta forma se consigue por un lado metil terc-butil éter, y por el otro un segundo refinado con un 77% de alquenos (1-buteno y 2-buteno) y un 23% de butanos que se separan.

Los alquenos se transforman en clorhidrinas mediante un proceso de clorhidrinación en el que interviene una disolución acuosa de HCl. En presencia de hidróxido sódico, los compuestos clorados se ciclan, dando lugar a una mezcla de óxidos de butileno que son sometidos a una hidrólisis con exceso de agua a 50 bar y 160-220 °C obteniendo finalmente, una mezcla racémica de butanodioles.

Este proceso presenta varias desventajas al tratarse de una operación con altos costes económicos y energéticos: se requieren elevadas temperaturas y presiones, así como una materia prima que durante los últimos tiempos ha alcanzado precios récord (unos 120\$ cada barril de petróleo). Además, esta vía productiva acarrea dificultades prácticas al trabajarse con pH ácidos y básicos marcados (se emplea ácido clorhídrico y sosa caustica, respectivamente) y supone un notable impacto ambiental ya que las severas condiciones de operación se consiguen mediante el uso de combustibles fósiles [10].

• Ruta bioquímica:

La ruta bioquímica consiste en la fermentación de productos agrícolas que presenten un contenido significativo en hidratos de carbono.

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere de oxígeno y cuyo producto final es un compuesto orgánico. Existen tres tipos de fermentación: la fermentación aerobia, que se realiza en presencia de oxígeno, la fermentación anaerobia, la cual no requiere de oxígeno y la fermentación mixta. Algunos ejemplos de fermentaciones son la alcohólica, láctica, butírica, etc. En este trabajo trataremos la fermentación para la obtención de 2,3-butanodiol.

Esta fermentación puede ser llevada a cabo por una gran variedad de microorganismos que tienen la capacidad de producir de forma natural 2,3-butanodiol, estando esta síntesis acompañada de la formación de ácidos orgánicos. Estos microorganismos son bacterias anaerobias facultativas de los géneros: *Klebsiella, Aerobacter, Serratia, Erwinia* y algunas especies de *Bacillus y Aeromonas*. El producto final obtenido dependerá tanto de los carbohidratos a fermentar como del microorganismo empleado durante el proceso de fermentación.

La ruta bioquímica para la obtención de 2,3-butanodiol, tal y como se puede ver en la Figura 13, da comienzo con una fermentación de los carbohidratos, concretamente monosacáridos que se han obtenido tras la hidrólisis enzimática. Estos monosacáridos normalmente son glucosas, aunque también se pueden utilizar otros azúcares de 5 o 6 átomos de carbono [10]. A partir de esta fermentación se obtiene el ácido pirúvico, éste en lugar de transformarse en metabolitos





mayoritarios como son el acetato o el lactato, tal y como ocurre en la fermentación acética o láctica, es tratado con una enzima llamada α -acetolactato sintasa generando así α -acetolactato. A partir de este metabolito se puede obtener bien el diacetil, o bien por reacción con la enzima α -acetolactato descarboxilasa el isómero R de la acetoína. Por acción de la enzima (2R,3R)-2,3-butanodiol deshidrogenasa sobre el diacetil se obtiene también la R-acetoína, mientras que partiendo del diacetil y por tratamiento con las enzimas diacetil reductasa y (2S,3S)-2,3-butanodiol deshidrogenasa se produce el isómero S de la acetoína. Una vez que se tienen las dos formas isoméricas de la acetoína (R y S) se pueden obtener los tres isómeros del 2,3-butanodiol (2R,3R; 2S,3S; y meso) en función de las enzimas empleadas y del microorganismo seleccionado para el proceso. *Paenibacillus polymyxa* produce solamente la forma D (levorrotatoria), *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus subtilis* producen una mezcla de la forma D y de la meso, mientras que *Serratia marcescens* produce una pequeña cantidad de la forma L mezclada con la forma meso [11].

El proceso de fermentación dura entre 2 y 3 d, se inicia a un pH de 6 aproximadamente y ha de ser tamponado con CaCO₃ a un pH de alrededor de 5,6, puesto que como se ha visto en el laboratorio, durante el transcurso del proceso el medio se va acidificando. Por otra parte, la enzima α -acetolactato descarboxilasa requiere de un pH de 6 para formar acetoína de forma óptima, mientras que a partir de un pH de 7,8 deja de funcionar. En cuanto a la temperatura, se necesita que esté en el rango de entre 30-37 °C e inóculos del 1% v/v a partir de un cultivo que se encuentre en crecimiento activo.

La extracción del 2,3-butanodiol es difícil, ya que todos sus isómeros tienen elevados puntos de ebullición (alrededor de 180 °C), por ello primeramente se separa el etanol y a continuación se filtra el líquido. Hecho esto, el caldo se concentra por evaporación.







Figura 12: Obtención de 2,3-butanodiol mediante un proceso químico de craqueo de crudo de petróleo.



Figura 13: Ruta bioquímica para la obtención de 2,3-butanodiol.

1.4. Obtención del 2,3-Butanodiol mediante procesos de fermentación. Diagrama de bloques.



Figura 14: Diagrama de bloques de la SSF para la obtención de 2,3-BDO.

Como se indica en la Figura 14, el proceso de obtención del 2,3-butanodiol consiste en varias etapas. Inicialmente se puede realizar un pretratamiento para acondicionar las materias primas, a continuación se lleva a cabo una fase de hidrólisis enzimática para liberar, con ayuda de enzimas, los azúcares potencialmente fermentables (disacáridos y monosacáridos) y acto seguido se inicia la fermentación de dichos azúcares, para obtener 2,3-BDO. Posteriormente, es necesario llevar a cabo una etapa de separación, que permita la recuperación del compuesto de interés con la pureza requerida. A continuación, se describen brevemente las diferentes etapas:





1.4.1. Etapa de hidrólisis enzimática (sacarificación).

La sacarificación, también conocida como hidrólisis enzimática, consiste en la ruptura de un carbohidrato complejo o polisacárido en sus correspondientes componentes monosacáridos, mediante la acción de unas enzimas específicas. Los monosacáridos obtenidos serán el sustrato de la etapa de fermentación.

La hidrólisis enzimática ha demostrado ser el método más favorable para hidrolizar la celulosa y el almidón en monómeros de glucosa, puesto que este proceso presenta una alta especificidad de producción de productos finales, no es tóxico y los tiempos de reacción son cortos, de aproximadamente 48-72 horas, sin embargo la tecnología enzimática no ha logrado aún obtener enzimas o compuestos que hidrolicen el 100 % de la biomasa y los costes son elevados, pero sin duda es la tecnología que más avances ha tenido en los últimos tiempos.

Algunos de los parámetros que afectan al transcurso de la hidrólisis enzimática son los siguientes:

- Carga de sustrato: es la cantidad de material que se agrega al sistema. La carga máxima de sustrato a utilizar será aquella que permita llevar a cabo el proceso con la mayor eficiencia posible y que no represente un impedimento para la dinámica de las reacciones [12].
- Carga enzimática: es el volumen de preparado enzimático que se adiciona a la cantidad de biomasa a hidrolizar. El volumen adecuado es aquel que garantice una actividad enzimática óptima sobre el sustrato y por tanto una hidrólisis lo más completa posible de la biomasa [13].
- Temperatura: cada enzima desempeña su máxima actividad en un rango de temperaturas determinado, por lo tanto, la temperatura de reacción debe de ser aquella en la que se produzca una catálisis eficiente.

A continuación, se presenta como ejemplo la hidrólisis enzimática de una molécula de sacarosa, la cual se transforma en una molécula de glucosa y otra de fructosa por la acción de las enzimas invertasas (Figura 15). Previamente, esta molécula de sacarosa se ha obtenido a partir de otra hidrólisis enzimática, en este caso de un polisacárido.



Figura 15: Hidrólisis enzimática de la sacarosa.

1.4.1.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante y el principal componente estructural de las células vegetales en plantas, verduras, hortalizas, maderas y fibras naturales. Se trata de un polímero lineal, donde las cadenas de celulosa se unen mediantes puentes de hidrógeno.





Es un polisacárido, concretamente un homopolisacárido, rígido e insoluble en agua, constituido por varios cientos o incluso varios miles de moléculas de β -glucosa que se entrelazan mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos [14].

La hidrólisis enzimática de la celulosa ocurre en dos etapas, como se puede ver en la figura 3 y que se explican a continuación:

- Hidrólisis primaria: esta primera hidrólisis ocurre en la superficie del material sólido y participan las enzimas endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces internos β-1,4-O-glucosídicos de forma aleatoria, y las enzimas celobiosahidrolasas (también llamadas exoglucanasas), cuya misión es desprender unidades de celobiosa de los extremos de la cadena de celulosa.
- Hidrólisis secundaria: esta segunda etapa se da en la fase líquida y participan las enzimas β-glucosidasas, las cuales hidrolizan cada unidad de celobiosa en dos unidades de glucosa.



Figura 16: Mecanismo de hidrólisis de la celulosa [14].

Esta hidrólisis enzimática presenta inhibición por sustrato e inhibición por producto final, lo que puede afectar en gran medida a la liberación de glucosa. Los parámetros de operación óptimos, con los que se consigue las mayores cantidades de glucosa son los siguientes:

Tabla 3: Parámetros de operación óptimos para la hidrólisis enzimática de la celulosa.

Temperatura	45-55 °C
рН	4-5
Dosis de celulasa	10-30 [FPU/material celulósico]
Tiempo de actuación	48-72 horas

1.4.1.2. Hidrólisis enzimática del almidón.

El almidón es el principal polisacárido de reserva energética en la mayoría de los vegetales y de las plantas. Está constituido, a su vez, por dos polímeros distintos de glucosa, con diferente





estructura, pero muy similares: la amilosa (aproximadamente el 25 %) y la amilopectina (el 75 % restante). Estas moléculas tienen un alto peso molecular y están organizadas en gránulos semicristalinos, contienen regiones cristalinas y no cristalinas en capas alternadas.

La amilosa es un polímero de cadena lineal formado por la unión de varios centenares o incluso miles de α -D-glucopiranosas mediante enlaces α -(1,4), por lo que la maltosa es el disacárido que se repite. Presenta una estructura amorfa y sin ramificar, o muy escasamente ramificada. Su cadena adopta una disposición helicoidal con seis monómeros (unidades de glucosa) por cada vuelta de hélice. El interior de la hélice contiene únicamente átomos de hidrógeno, mientras que los grupos hidroxilo se encuentran en el exterior

La amilopectina es un polímero que también está constituido por α -D-glucopiranosas unidas mediante enlaces α -(1,4), sin embargo, presenta una estructura muy ramificada, aproximadamente cada 24 o 30 unidades de glucosa existe una ramificación unida a la cadena principal mediante un enlace α -(1,6), este hecho hace que su estructura sea mucho más estable y que exista una mayor dificultad a la hora de romper sus enlaces, por lo que se hidroliza de una forma más lenta que la amilosa. Su peso molecular es más elevado que el de la amilosa.

Atendiendo a la estructura y características de los gránulos de almidón, aproximadamente el 25 % de su masa es amorfa y el 75 % es cristalino. En las zonas amorfas es donde se localiza predominantemente la amilosa, mientras que en las zonas cristalinas predomina la amilopectina.

La hidrólisis enzimática del almidón depende de varios factores, como son: su estructura granular, el tamaño y el tipo de cristal que presenta el grano, el porcentaje de amilosa y amilopectina y el peso molecular del polisacárido.

El almidón se puede degradar con varios tipos de enzimas, sin embargo, el uso de una u otra enzima determinará el producto final obtenido. Por ejemplo, para enzimas exoamilasas como es el caso de las glucoamilasas y α -glucosidasas, los productos finales obtenidos son glucosas o maltosas, mientras que para enzimas endoamilasas como la α -amilasa, se obtienen como productos oligosacáridos y dextrinas [15].

1.4.2. Etapa de fermentación.

Como se ha explicado en la ruta bioquímica, concretamente dentro del Apartado 1.3.2, la fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, que no requiere de oxígeno y cuyo producto final es un compuesto orgánico. El proceso de obtención del 2,3-butanodiol por fermentación ya se ha explicado, así como sus propiedades y aplicaciones.

Los productos mayoritarios obtenidos tras la etapa de fermentación son: en primer lugar, el 2,3butanodiol, en segundo lugar el etanol y en tercera posición, con una concentración muy inferior a los otros dos, la acetoína.





• Acetoína:

La acetoína es también conocida como 3-hidroxibutanona (Figura 17), es un compuesto orgánico líquido, con un ligero olor a almendras, producido de forma natural por las levaduras durante la fermentación alcohólica pero sobre todo, interviene como precursor en la biosíntesis del 2,3-butanodiol. Se emplea como almacén natural de energía en las funciones metabólicas de algunas bacterias fermentativas.



Figura 17: Estructura de la acetoína.

Algunas de sus propiedades físicas más características las podemos observar en la siguiente tabla:

Tahla 4.	Proniedades	físicas de	In	acetoína
1 ubiu 4.	FIOPIEUUUES	jisicus ue	iu	ucetomu.

Fórmula	C ₄ H ₇ OH
Densidad	1012 Kg/m ³
Masa molar	88,11 g/mol
Punto de fusión	15 °C
Punto de ebullición	148 °C

Este compuesto se puede sintetizar de dos maneras: la primera de ellas es mediante la descarboxilación del α -acetolactato empleando como enzima el α -acetolactato descarboxilasa, que cataliza la reacción química. Esta enzima pertenece a la familia de las liasas. De esta forma se obtiene la R-acetoína.

Para la obtención de la S-acetoína necesitamos un compuesto intermedio como es el diacetil, para ello la enzima α -acetolactato sintasa transforma el ácido pirúvico en α -acetolactato. El α acetolactato se convierte en diacetil y al tratar éste con las enzimas diacetil reductasa y (2S,3S)-2,3-butanodiol deshidrogenasa se produce el isómero S de la acetoína [16].

• Etanol:

Se trata de un compuesto orgánico perteneciente al grupo de los alcoholes (Figura 18). En condiciones normales es un líquido incoloro, volátil, inflamable y completamente soluble en agua, que al mezclarse con él en culquier proporción da una mezcla azeotrópica. Se encuentra solo por detrás del metanol en la lista de los alcoholes mas producidos.

Sus propiedades químicas vienen dadas por el grupo funcional alcohol –OH, el cual interviene en reacciones industriales de gran importancia [17].







Figura 18: Estructura del etanol.

En la siguiente tabla se pueden observar algunas de las propiedades más características del etanol [18]:

Nombre	Etanol
Fórmula	C ₂ H ₅ OH
Masa molar	46,07
Densidad (20 °C)	789 kg/m ³
Punto de ebullición normal	78,39 °C
Capacidad calorífica (20 °C)	111,1 J mol ⁻¹ K ⁻¹
Calor de evaporación (70 °C)	855,66 kJ/kg
Temperatura de autoignición	425 °C

Tabla 5: Propiedades físicas del etanol.

Existen distintas maneras para la obtención de etanol. Desde los tiempos más antiguos una de las formas para obtenerlo es por fermentación anaeróbica de una disolución con un contenido alto en azúcares, actualmente por fermentción de productos agrícolas se obtienen 24x10⁶ Tm de etanol al año.

El proceso de fermentación que se realiza es llevado a cabo casi mayoritariamente por levaduras, que son las encargadas de fermentar los azúcares más simples de la materia prima transformándolos en etanol y CO₂. Este proceso de fermentación se realiza de manera anaerobia, es decir, en ausencia de oxígeno. La levadura seleccionada para el proceso depende en gran medida del tipo de carbohidrato empleado como materia prima.

Una vez obtenido el piruvato (Figura 19), se descarboxila no oxidativamente por la acción de la descarboxilasa pirúvica, se trata de una enzima que requiere de TPP y Mg²⁺ para producir acetaldehído y CO₂. A continuación, tiene lugar una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, en la que el acetaldehído actúa como aceptor de electrones del NADH + H⁺, produciendo así etanol y NAD⁺ [19].



Figura 19: Obtención del etanol por fermentación.

1.4.3. SSF, como alternativa de intensificación de procesos.

La hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas (SSF) presenta una serie de ventajas frente a realizar cada etapa por separado: al utilizar un microorganismo capaz de asimilar la glucosa y en general los azúcares hidrolizados, el equilibrio de la reacción de hidrólisis es desplazado permitiendo una mayor generación de azúcares simples y, por ende, una cantidad final mayor de 2,3-butanodiol; el no separar la parte líquida de la sólida evita la potencial pérdida de azúcares remanentes en ésta; la presencia de un microorganismo implica la posible degradación de compuestos tóxicos provenientes de la etapa de pretratamiento y que podrían afectar a la actividad enzimática; por último, el realizar dos etapas en un mismo reactor implica un menor uso de recursos, tanto económicos como de tiempo [20].





2. Objetivos.

El objetivo de este proyecto es realizar el diseño de un biorreactor que permita obtener 2,3-BDO a partir de destrío de zanahoria mediante sacarificación y fermentación simultáneas.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos.

- Caracterizar, mediante experimentación, el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, analizando los principales parámetros de operación, como son:
 - > Carga de enzimas en el proceso SSF.
 - Aeración en el proceso de fermentación. Para ello, se determinará el coeficiente de transporte de oxígeno.
 - Sistema de agitación, trabajando con diferentes impulsores.
- Dimensionar, a partir de los resultados obtenidos en la experimentación, un biorreactor continuo de tanque agitado, calculando el volumen del biorreactor, el tipo de agitador, las necesidades de agitación y aeración y las necesidades de intercambio de calor.

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



ESCUELA DE INGENIERÍAS

3. Materiales y métodos.

3.1. Materia prima.

Como materia prima se emplea destrío de zanahoria suministrado por la empresa Huercasa. El destrío de zanahoria se molió hasta un tamaño de partícula de 1-3 mm utilizando una trituradora doméstica y se almacenó a 4 °C antes de utilizarlo en los ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación de BDO.

La composición estructural de la materia prima es (% m/m de materia seca): ácido galacturónico, 11,2 ± 0,2; celulosa, 11,2 ± 0,1; hemicelulosa, 5,5 ± 0,3 (galactosa + fructosa, 4,2 ± 0,2; arabinosa, 2,0 ± 0,2); lignina insoluble en ácido (LIA), 0,3 ± 0,0; lignina soluble en ácido (LSA), 1,6 ± 0,0; extractivos, 58,8 ± 0,4 (extractivos en agua, 42,6 ± 0,3: ácido galacturónico, 1,2 ± 0,0; glucosa, 15,3 ± 1,9; galactosa + fructosa, 12,6 ± 1,3; arabinosa, 0,7 ± 0,3; extractos de etanol, 16,1 ± 0,4); cenizas, 7,5 ± 0,4; y grupos acetilo, 0,6 ± 0,0.

3.2. Hidrólisis enzimática.

Para obtener el hidrolizado enzimático de CD, se llevó a cabo un proceso de hidrólisis enzimática con CD como sustrato (carga 10% p/v: 25 g de sustrato y 250 mL de solución enzimática) en matraces Erlenmeyer de 1000 mL a 50 °C, presión atmosférica, 150 rpm, 24 h y pH 4,8, empleando un agitador orbital. El disolvente utilizado fue agua, ajustándose el pH a 4,8 con hidróxido potásico (KOH) 10 M al inicio y durante todo el proceso. Se utilizó una mezcla de enzimas Cellic CTec2 y Viscozyme (actividad enzimática de 90 y 54,5 unidades de papel de filtro (FPU)/mL, respectivamente), a una carga enzimática de 10 FPU/g de sustrato para ambas enzimas. Las condiciones de hidrólisis enzimática se seleccionaron sobre la base de resultados anteriores. Una vez completada la hidrólisis enzimática, el hidrolizado enzimático obtenido se filtró al vacío, se midió su contenido en azúcares y finalmente se utilizó como medio de fermentación en la producción de BDO.

3.3. Fermentación (microorganismo, medio de cultivo, medio de fermentación).

Existen diversos microorganismos capaces de producir 2,3-butanodiol, todos ellos son bacterias anaerobias facultativas que pertenecen a los géneros: *Bacillus, Serratia, Enterobacter, Klebsiella*.

En el caso de este proyecto, el microorganismo empleado es *Paenibacillus polymyxa*. Este microorganismo reactivado se almacena en crioviales de 2 mL (0,9 mL de microorganismo y 0,9 mL de glicerol al 80 %) en un congelador a -80 °C. En la siguiente imagen se puede observar un ejemplo de ello.



Universidad deValladolid





Figura 20: Crioviales de 2 mL (0,9 mL de microorganismo y 0,9 mL de glicerol al 80 %).

Para que el inóculo (*Paenibacillus polymyxa*) crezca y pueda ser utilizado de manera satisfactoria en cada uno de nuestros experimentos es necesario crear 90 mL de un medio, que recibe el nombre de medio Häβler [21], antes de comenzar cualquier proceso. Este medio se compone de:

- Agua destilada, 90 mL.
- Glucosa, 2 gramos, con una concentración de 20 g/L.
- Extracto de levadura, 1 gramo, cuya concentración debe de ser 10 g/L.
- MgSO₄, 0,02 gramos, de concentración 0,2 g/L.
- (NH₄)₂SO₄, 0,3 gramos, con una concentración de 3 g/L.

Una vez que se tiene este medio, se añaden las disoluciones tampón empleadas durante todos los experimentos, las cuales permiten mantener el pH en el valor óptimo para llevar a cabo la fermentación (pH 6). Éstas son:

- 1,32 mL de K₂HPO₄.
- 8,68 mL de KH₂PO₄.

Finalmente se añaden:

- 0,3 mL de elementos traza.
- 1 mL del criovial que contiene el microorganismo *Paenibacillus polymyxa*, el cual estará congelado en el frigorífico del laboratorio.

Tras elaborar el medio Hä β ler, se lleva el matraz que lo contiene a un orbital donde se somete a una agitación continua de 200 rpm con una temperatura constante de 37 °C.

Hecho esto se comprueba su absorbancia en el espectrofotómetro, la cual indica si el inóculo crece correctamente. Se toma una muestra del medio en un eppendorf y se realiza una dilución 1:10, es decir 0,1 mL del medio con 0,9 mL de agua destilada. Se mide la absorbancia de la dilución a una longitud de onda de 600 nm.

A continuación, en el espectrofotómetro se usa como blanco una cubeta con agua destilada y acto seguido se introduce en él la cubeta con la dilución 10, se espera a que la medida se estabilice y se obtiene una absorbancia de aproximadamente 0,6 lo que indica que el crecimiento es adecuado.





Resulta de gran importancia comprobar si el crecimiento del inóculo se realiza de forma correcta, ya que si no es así contaminará con total seguridad el experimento.

El rendimiento del proceso de fermentación se determina a partir del cálculo del coeficiente de rendimiento y de la productividad para el tiempo en el que se obtiene la mayor concentración de producto, de acuerdo con las siguientes expresiones:

Rendimiento (g/g):

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_0 - S}$$

Ecuación 1

donde S_0 es la concentración de sustrato a tiempo inicial y S y P las concentraciones de sustrato y producto respectivamente al tiempo de máxima producción.

• Productividad (g·L⁻¹·h⁻¹):

$$Q = \frac{P}{t}$$
 Ecuación 2

3.4. Métodos analíticos.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) determinó el contenido de ácido galacturónico, azúcares (glucosa, galactosa + fructosa y arabinosa) y productos de fermentación (BDO, etanol y acetoína), utilizando un detector de índice de refracción (Waters 2414), una columna Aminex HPX-87H (a 60 °C) y 0,01 N H_2SO_4 (0,6 mL/min) como fase móvil.

La concentración celular en los ensayos de fermentación, se determinó mediante el método del peso seco, filtrando las muestras a través de filtros de nitrato de celulosa de 0,2 μm (Sartorius 254 stedim Biotech, Göttingen, Alemania) y, se calculó como la relación entre la masa seca de la biomasa y el volumen de la muestra filtrada.

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado y se muestran los resultados medios.

3.5. Ensayos realizados.

Para determinar la concentración de 2,3-butanodiol obtenida en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas a partir del destrío de zanahoria se han realizado varios experimentos en los que se modifica: el recipiente en el que tiene lugar el proceso, la concentración enzimática de cada uno de ellos, la velocidad de agitación que se le aplica al medio y el sistema de agitación utilizado. Finalmente se realizan dos experimentos con aeración (introducción de un flujo constante de oxígeno), uno con agitación constante y otro sin agitación.

Para acabar con la parte experimental, se llevan a cabo cuatro procesos con aeración que permiten calcular y determinar el coeficiente de transporte de oxígeno en cada uno de ellos.





3.5.1. Obtención de datos cinéticos.

Para llevar a cabo este experimento y obtener los datos cinéticos del proceso se procede a trabajar con ocho pruebas en ocho matraces de 250 mL cada uno de ellos. Se introduce un volumen de trabajo de 100 mL en cada uno de los cuatro de por la mañana, dos de ellos para las pruebas a 5 FPU/g y otros dos para las pruebas a 10 FPU/g. Se realiza la misma operación por la tarde, con los cuatro matraces restantes. En el Anexo 10.1 se puede contrastar el proceso llevado a cabo.

Momento del día	Volumen de trabajo (mL)	Carga enzimática (FPU/g)	Aeración (vvm)	Tipo de agitador
	100	5	-	Incubador orbital
Mañana	100	5	-	Incubador orbital
	100	10	-	Incubador orbital
	100	10	-	Incubador orbital
	100	5	-	Incubador orbital
Tarde	100	5	-	Incubador orbital
	100	10	-	Incubador orbital
	100	10	-	Incubador orbital

Tabla 6:	Ensavos	llevados a	cabo para	determinar	los datos	cinéticos del	proceso.
1 4 5 1 4 5 .	Lingayos	nerados a	case para	acterninar	105 44105	chieticos aci	<i>pioccsoi</i> .

3.5.2. Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno.

Una parte muy importante de este trabajo es calcular el coeficiente de transporte de oxígeno, para ello se prepara un medio con un volumen de 700 mL de agua destilada, en el que se disuelven una serie de componentes, que se explicará en los anexos.

En este proceso se realizan cuatro experimentos para oxigenar el medio y calcular el coeficiente de transporte de oxígeno, en cada caso. En dos de ellos se emplea un flujo de entrada de oxígeno de 0,2 vvm y una agitación de 50 rpm y 100 rpm respectivamente, mientras que en los otros dos se utiliza un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y una velocidad de agitación de 50 rpm y 100 rpm, respectivamente. En todos ellos se parte de un 0 % de oxígeno al inicio del proceso. El Anexo 8.2 contiene toda la información sobre estos experimentos.

Volumen de trabajo (mL)	Aeración (vvm)	Tipo de agitador	Velocidad de agitación (rpm)
700	0,2	Turbina de disco	50
700	0,2	Turbina de disco	100
700	0,7	Turbina de disco	50
700	0,7	Turbina de disco	100

Tabla 7: Ensayos llevados a cabo para determinar el coeficiente de transporte de oxígeno.





3.5.3. Ensayos SSF en BDTA.

Los ensayos desarrollados a continuación se han llevado a cabo para determinar la influencia del tipo de agitador, de la carga enzimática y de la aeración en el contenido del interior del biorreactor, cada cierto período de tiempo.

La explicación del proceso seguido para calcular el volumen de enzimas necesario, así como para la creación del medio de fermentación, en cada uno de los procesos, se encuentra en los anexos, al final del presente TFG.

Cabe destacar que, tras verter las enzimas necesarias para la hidrólisis enzimática en el biorreactor, no es necesario adicionar agua ya que, como simultáneamente se va a realizar un proceso de fermentación se va a añadir en él una disolución de nutrientes, un sistema tampón y una disolución de inóculo (*Paenibacillus polymyxa*), siendo la suma de estos volúmenes superior a la cantidad de agua necesaria. El Anexo 8.3 contiene todos los procedimientos llevados a cabo, con su correspondiente explicación.

Los ensayos desarrollados han sido los siguientes:

Tabla 8: Ensayos llevados a cabo para determinar la influencia del tipo de agitador, de la carga enzimática y de la aeración.

Volumen de trabajo (mL)	Carga enzimática (FPU/g)	Aeración (vvm)	Tipo de agitador	Velocidad de agitación (rpm)
300	5	-	Hélice	200
300	5	-	Turbina de disco	200
700	5	-	Turbina de disco	50
700	10	-	Turbina de disco	50
700	5	0,2	Turbina de disco	50
700	5	0,7	-	-





4. Resultados.

4.1. Obtención de datos cinéticos (ensayos en los erlenmeyers e incubador orbital).

En este apartado se van a mostrar los resultados y las gráficas a las que se ha llegado tras la realización de los experimentos a dos concentraciones enzimáticas diferentes (5 FPU/g y 10 FPU/g). Se discutirá a cerca del consumo de los azúcares a lo largo de cada uno de los procesos y se conocerá la concentración de cada producto a medida que transcurre el tiempo, así como la concentración máxima de cada uno de ellos. Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22 así como en las Tablas experimentales 1 y 2 de los anexos.





Figura 21: Consumo de azúcares durante la SSF a 5 FPU/g.



Como cabe de esperar, en ambos experimentos la concentración global de azúcares disminuye con el paso del tiempo, puesto que éstos son el sustrato que se consume durante el proceso. Como se aprecia en las Figuras 21 y 22, la concentración de glucosa aumenta en las primeras 12h del proceso, debido a la adición de enzimas. La mayor concentración de glucosa se obtiene cuando se trabaja con la mayor concentración de enzimas (10 FPU/g) en el proceso. Del mismo modo, el consumo de glucosa es mayor que el del resto de azúcares, agotándose completamente a las 48h para la carga de enzimas más baja (5 FPU/g).

Por su parte, la celobiosa se observa que no desaparece del todo. Su concentración va disminuyendo progresivamente, con la presencia de algunos valles, pero nunca llega a agotarse. Al finalizar el proceso existe una concentración de celobiosa de alrededor de 2,5 g/L en ambas gráficas.

La concentración de fructosa para una concentración enzimática de 5 FPU/g va disminuyendo, hasta desaparecer a las 72h, mientras que a una concentración de 10 FPU/g su concentración también disminuye con el paso del tiempo, pero en torno a las 60h, esta tendencia cambia y se mantiene, aparentemente, constante.

En ambos casos, la presencia de arabinosa es casi testimonial, con una concentración máxima inferior a 1 g/L. A las 60h acaba desapareciendo por completo.





El consumo total de azúcares es del 95% en el caso del experimento a 5 FPU/g, mientras que en el proceso a 10 FPU/g es de aproximadamente el 93%.





Figura 23: Obtención de productos durante la SSF a 5 FPU/g.



La concentración de 2,3-butanodiol crece rápidamente en ambos procesos (Figuras 23 y 24), obteniéndose una concentración de 2,3-butanodiol de 26,21 g/L a las 47 h cuando se trabajó con una carga de enzimas de 5 FPU/g, resultado muy similar al obtenido con 10 FPU/g, en este caso 26,5 g/L. La máxima concentración se obtuvo a las 144 horas (28,05 g/L con una carga de enzimas de 5 FPU/g y 27,13 g/L con una carga de enzimas de 10 FPU/g). La mayor concentración de 2,3-butanodiol a las 47h coincide con el consumo total de glucosa en el caso de utilizar la menor cantidad de enzimas (5 FPU/g, Figura 21).

La concentración de acetoína aumenta a lo largo del tiempo, alcanzando un valor máximo de 2,76 g/L (5 FPU/g) y, de 1,2 g/L (10 FPU/g). Como se puede observar en ambas gráficas, el 2,3-butanodiol es, con mucho, el producto mayoritario en este proceso.

La concentración de etanol aumenta en ambos procesos hasta llegar a un máximo de, en torno, 3 g/L a las 48h. A partir de este momento dicha concentración es cada vez menor.

En resumen, es posible trabajar con la menor cantidad de enzimas en el proceso, 5 FPU/g, ya que no parece influir en la concentración final de 2,3-butanodiol que es posible alcanzar. Además, se puede concluir que, cuando se trabaja en modo discontinuo, la fermentación finaliza en 48 horas.

De acuerdo con la expresión del rendimiento expuesta en el Apartado 3.3 (Ecuación 1), se ha calculado el rendimiento de los procesos con ambas cargas enzimáticas (5 FPU/g y 10 FPU/g) a las 47h, ya que es cuando se consigue la máxima producción de 2,3-BDO, tal y como se muestra a continuación:

5 FPU/g \rightarrow 0,511 g/g

10 FPU/g \rightarrow 0,415 g/g

De igual modo, se ha obtenido la productividad alcanzada en ambos procesos a las 47h, conforme a la expresión existente en el Apartado 3.3 (Ecuación 2) de la presente memoria, siendo los resultados los siguientes:

5 FPU/g → 0,558 g·L⁻¹·h⁻¹ 10 FPU/g → 0,564 g·L⁻¹·h⁻¹





Ecuación 3

Una vez obtenidos los datos cinéticos, se procede a su ajuste a un modelo cinético. En este caso, se propone el modelo de Monod modificado, que tiene en cuenta la inhibición por sustrato y que responde a la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_m * S}{K_S + S} * \left(1 - \frac{S}{S^*}\right)^n$$

donde S* representa la concentración de sustrato a partir de la cual se observa inhibición del crecimiento celular (g/L) y n es el grado de inhibición por sustrato.

Por otra parte, para la obtención de los parámetros cinéticos se comienza aplicando la expresión general del balance de materia en un reactor (Ecuación 4). Como se trata de un reactor discontinuo de tanque agitado en el que no hay flujo de entrada ni de salida, la velocidad de acumulación es igual a la de generación por reacción química y por tanto:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = Vr_i - (Q_{ent}C_{i,ent} - Q_{sal}C_{i,sal}) \qquad Ecuación 4$$

donde t es el tiempo (h), V es el volumen del reactor (L), C_i es la concentración de un determinado compuesto bien a la entrada o a la salida, en función del subíndice que lo acompañe (g/L), r_i es la velocidad de reacción que presenta un determinado compuesto (g/Lh) y Q es el flujo volumétrico a la entrada o salida del reactor (L/h).

Acto seguido, se plantea el balance a la biomasa celular (X), en el que se considera que el volumen del reactor permanece sin alteraciones, es decir, constante en todo momento (Ecuación 5):

$$\frac{d(VX)}{dt} = Vr_x \quad \rightarrow \quad \frac{dX}{dt} = r_x = \mu X \qquad Ecuación 5$$

donde X es la concentración celular (g/L), r_x es la velocidad de formación de células (g/Lh) y μ es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).

A la hora de obtener los balances generales para el sustrato (S, azúcares) y el producto (P, 2,3-BDO) expresados en las Ecuaciones 6 y 7, se tiene en cuenta el rendimiento de sustrato en biomasa (Ecuación 6) y el rendimiento de sustrato en producto (Ecuación 7).

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS}$$

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS}$$
Ecuación 7
Ecuación 7

La expresión del balance general para el sustrato es la siguiente:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X \qquad Ecuación 8$$

La expresión del balance general para el producto es la siguiente:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu X \qquad Ecuación 9$$





donde S es la concentración del sustrato (g/L), donde se puede referir a los azúcares totales o a cada uno por separado, $Y_{X/S}$ es el rendimiento de sustrato en células (g/g), P es la concentración de 2,3-BDO (g/L) y $Y_{P/S}$ es el rendimiento de sustrato en producto (g/g).

Finalmente, agrupando las Ecuaciones 3 y 4, las cuales hacen referencia al modelo de Monod modificado (que tiene en cuenta la inhibición por sustrato) y al balance de materia a las células, se obtiene como modelo más ajustado la Ecuación 10.

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu X = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} X \left(1 - \frac{S}{S^*}\right)^n \qquad Ecuación \ 10$$

donde μ_{max} es la velocidad específica de crecimiento máxima (h⁻¹), Ks es la constante de Monod o constante de saturación del sustrato (g/L), S* es la concentración de sustrato para la que no hay crecimiento celular (g/L) y n es el grado de inhibición por sustrato.

Los parámetros cinéticos obtenidos son los siguientes:

Tabla 9: Parámetros cinéticos obtenidos.

Ks (g/L)	S* (g/L)	µ _{max} (h⁻¹)	Y _X (g/g)	n
2,574	228	0,641	0,167	0,39

4.2. Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno.

El coeficiente de transporte de oxígeno se calcula como la pendiente de la recta que se obtiene al representar gráficamente el tiempo (en minutos) en el eje X frente al $Ln\left(1-\left(\frac{Co2}{Co2*}\right)\right)$ en el eje Y.

Donde Co_2^* es la concentración de oxígeno en el equilibrio, la cual se supone como el 100% y Co_2 es la concentración de oxígeno en el medio en cada instante de tiempo.

Como se ha comentado con anterioridad, se llevaron a cabo cuatro experimentos, de los cuales se van a representar gráficamente aquí sus resultados (Figuras 25 a 28). Las tablas con los valores numéricos se encuentran en los anexos (Tabla experimental 3, 4, 5 y 6).




• Flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 50 rpm.



Figura 25: Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno para un flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 50 rpm.

A la vista de la tabla obtenida (Tabla experimental 3 en anexos) y de la Figura 25, se obtiene un valor del coeficiente de transporte de oxígeno de 0,163 min⁻¹, para una aeración constante de 0,2 vvm y una velocidad de agitación de 50 rpm.

$$kl * a = 0,163 \text{ min}^{-1}$$



• Flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 100 rpm.

Figura 26: Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno para un flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 100 rpm.

Según los valores obtenidos para cada instante de tiempo, la pendiente de la recta en el caso de tener un flujo de oxígeno constante de 0,2 vvm y una agitación de 100 rpm es de -0,153 (Figura 26), por lo que este número en positivo es el coeficiente de transporte de oxígeno, en este segundo experimento.

$$kl * a = 0,153 \text{ min}^{-1}$$





En los dos experimentos anteriores se ha mantenido constante en 0,2 vvm el flujo de oxígeno que entra en el BDTA y se ha aumentado la agitación de la turbina de disco de 50 rpm a 100 rpm. Como referencia a nuestros resultados se puede decir que, el coeficiente de transporte de oxígeno apenas ha variado al incrementar al doble la velocidad de agitación de la turbina, por lo que con flujos de oxígeno introducidos bajos, la velocidad de agitación de la pala no influye en el resultado.



• Flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 50 rpm.

Figura 27: Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno para un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 50 rpm.

En este caso, para un flujo constante de oxígeno de 0,7 vvm y una velocidad de agitación de 50 rpm se obtiene un coeficiente de transporte de oxígeno de 0,184 min⁻¹, como se puede ver en la Figura 27. Resultado muy similar al obtenido en los experimentos anteriores.

$$kl * a = 0,184 \text{ min}^{-1}$$

• Flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 100 rpm.



Figura 28: Cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno para un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 100 rpm.





A partir de la gráfica obtenida (Figura 28), para un flujo constante de oxígeno de 0,7 vvm con una velocidad de agitación del medio de 100 rpm, el coeficiente de transporte de oxígeno es 0,296 min⁻¹, un resultado algo mayor que en el resto de los experimentos.

$$kl * a = 0,296 \text{ min}^{-1}$$

En los dos últimos experimentos se ha mantenido constante el flujo de oxígeno introducido en el medio en 0,7 vvm, mientras que la velocidad de agitación se ha duplicado de 50 rpm a 100 rpm.

Cuando el flujo de oxígeno introducido es mayor, en este caso 0,7 vvm, el aumento en la velocidad de agitación del medio conlleva un aumento en el coeficiente de transporte de oxígeno, tal y como ha quedado reflejado en los dos últimos procesos llevados a cabo.

También se puede concluir que, a mayor flujo de oxígeno introducido mayor será la variación del coeficiente de transporte entre dos velocidades de agitación diferentes.

4.3. Ensayos SSF en BDTA.

4.3.1. Influencia del tipo de agitador.

Este proceso tiene lugar en un reactor pequeño, de 500 mL de volumen total, en el que se introduce un volumen de trabajo de 300 mL. Las condiciones del proceso son 37 °C, una velocidad de agitación de la pala de 200 rpm y una concentración de ambas enzimas de 5 FPU/g. Como se ha descrito con anterioridad, este proceso se realiza con dos palas de agitación diferentes, primeramente con un agitador de tipo hélice y en segundo lugar con una turbina de disco. A continuación, se pueden comparar gráficamente los resultados obtenidos con ambas palas, tanto en el consumo de azúcares como en la obtención de los productos. Sus tablas con los valores numéricos se encuentran en el anexo (Tablas experimentales 7 y 8).





Universidad de Valladolid





Figura 29: Evolución de la concentración de azúcares y productos durante el proceso SSF. a y c) agitador de hélice, b y d) agitador de turbina de disco.

Al igual que en los ensayos cinéticos, se observa que, la cantidad global de azúcares disminuye a lo largo del tiempo, ya que es el sustrato que se consume para llevar a cabo el proceso de SSF.

La glucosa es el azúcar más abundante en el proceso. En el experimento llevado a cabo con la hélice como pala de agitación (Figura 29 a) se observa que inicialmente aumenta su concentración, para después mantenerse más o menos estable durante las primeras 24h, a continuación, su concentración disminuye rápidamente hasta alcanzar los 12 g/L a las 48h. Por su parte, en el experimento llevado a cabo con la turbina de disco (Figura 29 b), la glucosa aumenta ligeramente su concentración al inicio, seguido de un marcado descenso hasta llegar a agotarse a las 48h del proceso. El cambio de pala de agitación provoca que, al utilizar la turbina de disco, se consuma toda la glucosa.

Por su parte, la celobiosa, la fructosa y la arabinosa presentan gráficas muy similares en ambos procesos, y su concentración final apenas varía de un proceso a otro, es decir que el cambio de pala de agitación no les afecta.

El consumo total de azúcares en el proceso en el que se utiliza la hélice como pala de agitación es aproximadamente de 10 g siendo este el 65 %, mientras que en el proceso en el que se utiliza la turbina de disco es de 16,5 g lo que corresponde a un 91 %. Por lo que, al utilizar la turbina de disco se consume en el proceso una mayor cantidad de azúcares.

En la figura 29 c) se puede ver cómo, en el proceso en el que se utiliza un agitador de tipo hélice, la concentración de 2,3-butanodiol aumenta a medida que transcurre el tiempo, hasta alcanzar un máximo de 8,70 g/L a las 33h. A partir de este momento dicha concentración disminuye muy lentamente. Debido a la baja concentración de 2,3-butanodiol que se consigue en este proceso, se elige la opción de cambiar la pala de agitación por una que presente menor efecto cizalla, puesto que se considera que puede provocar la muerte prematura de las células.

Al cambiar la pala de agitación y utilizar la turbina de disco como agitador se observa, en la figura 29 d) que, la concentración máxima alcanzada de 2,3-butanodiol es de 6,84 g/L a las 22h, tiempo a partir del cual disminuye dicha concentración progresivamente. Con esta segunda pala también se puede ver que el etanol es el producto mayoritario, puesto que, al finalizar el proceso a las 48h, su concentración es la misma que la máxima alcanzada de 2,3-butanodiol y su gráfica permanece con una pendiente creciente.



ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

En ambos procesos, la acetoína es prácticamente un producto residual, ya que su concentración durante todo el proceso es muy baja.

Analizando los resultados obtenidos en el reactor de 500 mL, se puede afirmar que la pala que en teoría presenta un mayor efecto cizalla, en este caso el agitador de tipo hélice, provoca el efecto opuesto, ya que se ha conseguido una concentración máxima de 2,3-butanodiol ligeramente superior con ésta que con la turbina de disco.

4.3.2. Influencia de la carga de enzimas.

Estos procesos de SSF fueron llevados a cabo en un reactor de 2 L, con un volumen de trabajo de 700 mL, y dos cargas enzimáticas diferentes 5 FPU/g y 10 FPU/g, a una temperatura de 37 °C y a 50 rpm, empleando como agitador una turbina de disco. A continuación se procede a comparar gráficamente los resultados obtenidos a ambas concentraciones enzimáticas, tanto en el consumo de azúcares como en la obtención de los productos. Sus tablas con los valores numéricos se encuentran en el anexo (Tablas experimentales 9 y 10).

• Consumo de azúcares y obtención de productos con ambas cargas enzimáticas (5 y 10 FPU/g):



Figura 30: Evolución del consumo de azúcares y de productos durante el proceso SSF. a y c) carga de enzimas 5 FPU/g, b y d) carga de enzimas 10 FPU/g.





Al igual que en los experimentos anteriores, a medida que transcurre el proceso, la cantidad de azúcares totales disminuye ya que es el sustrato que se va consumiendo.

En ambos procesos es la glucosa la que presenta una pendiente más marcada, es decir, la que se consume más rápidamente, ya que inicialmente es la que presenta una concentración mayor y alcanza un valor próximo a 0 g/L a las 48h (Figuras 30 a y b).

Ambas gráficas (Figuras 30 a y b) son muy similares para los cuatro componentes. Para la fructosa, su concentración disminuye rápidamente durante las primeras 30h y luego sigue disminuyendo pero presenta un descenso mucho más pausado hasta llegar a su consumo casi total a las 48h.

La celobiosa, con una concentración enzimática de 5 FPU/g (Figura 30 a) presenta un descenso inicial más lento que la fructosa y alcanzadas las 30h su pendiente es casi nula, es decir, deja de consumirse. Para el proceso a una concentración enzimática de 10 FPU/g (Figura 30 b), su concentración inicial disminuye de forma similar al proceso a 5 FPU/g si bien cabe desatacar que, llegadas las 24h existe un breve período, de unas 3 o 4 horas, en el que su pendiente negativa se incrementa considerablemente llegando prácticamente a su consumo total. A partir de este momento, su concentración aumenta ligeramente y se mantiene constante en una baja concentración hasta el final del proceso

La arabinosa por su parte presenta una línea prácticamente recta (Figuras 30 a y b), es decir su escasa concentración inicial se mantiene durante todo el proceso o se incrementa ligeramente.

El consumo total de azúcares en el proceso a 5 FPU/g es algo inferior al 94 %, mientras que cuando se tiene una carga enzimática de 10 FPU/g el consumo asciende muy ligeramente por encima del 94 %. Por lo que se puede concluir que, independientemente de la carga enzimática empleada, se consume en el proceso el mismo porcentaje de carbohidratos, aproximadamente.

En el proceso con una concentración enzimática de 5 FPU/g (Figura 30 c), se puede observar como la concentración de 2,3-butanodiol existente en el reactor va aumentando rápidamente hasta llegar a un máximo de 14,96 g/L a las 31,5h. A partir de este momento, la concentración va disminuyendo lentamente debido al consumo de los azúcares que actúan como sustrato. Por su parte, en el experimento llevado a cabo a una concentración enzimática de 10 FPU/g (Figura 30 d), la concentración de 2,3-butanodiol también se incrementa rápidamente hasta llegar a un máximo de 14,40 g/L a las 30h, a continuación se comporta del modo esperado, disminuyendo su concentración de forma lenta hasta finalizar el proceso.

En ambos procesos, el segundo componente que se obtiene con mayor concentración es el etanol. Para el experimento a 5 FPU/g (Figura 30 c), su concentración aumenta progresivamente hasta llegar al final del proceso a su máxima concentración, de aproximadamente 7 g/L, mientras que para el proceso a 10 FPU/g (Figura 30 d), la concentración de etanol aumenta durante las primeras 33h muy rápidamente, alcanzando en este tiempo su concentración máxima (9,44 g/L) y a partir de entonces disminuye a una velocidad considerable.

Por su parte, la concentración de acetoína se mantiene constante durante las primeras 48 horas, en ambos procesos (Figuras 30 c y d). A partir de este momento, en el experimento realizado a 5 FPU/g, su concentración aumenta ligeramente hasta llegar a las 72h.





El volumen de NaOH añadido también se incrementa con el paso del tiempo puesto que el medio se hace cada vez más ácido, tal y como se puede ver en las Tablas experimentales 9 y 10 de los anexos.

Por lo que se refiere a la carga enzimática, no afecta en gran medida a la concentración máxima de 2,3-butanodiol obtenida, ya que ambos procesos apenas difieren en 5 décimas. Por lo que a la hora de trabajar en el laboratorio, y a la vista de los resultados obtenidos, se elegirá trabajar con una carga enzimática de 5 FPU/g para ahorrar en el volumen de enzimas empleado.

4.3.3. Influencia de la aeración.

Este proceso se ha llevado a cabo en el reactor de 2 L con un volumen de trabajo de 700 mL y a una concentración de 5 FPU/g, sin embargo, se realizaron dos experimentos con dos flujos diferentes de oxígeno. En uno de ellos se introdujo un flujo de 0,2 vvm con una agitación de 50 rpm y como agitador se empleó una turbina de disco, mientras que el otro fue llevado a cabo con un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y sin agitación. A continuación, se van a comparar ambos procesos tanto en lo referente al consumo de azúcares como en la obtención de los productos. Sus valores exactos se pueden observar en el apartado anexos (Tablas experimentales 11 y 12).

• Consumo de azúcares y obtención de los productos en los procesos con distinta aeración:





Universidad de Valladolid





Figura 31: Evolución del consumo de azúcares y de productos durante el proceso SSF. a y c) a 50 rpm y 0,2 vvm, b y d) sin agitación y 0,7 vvm.

El consumo de azúcares en los dos experimentos sigue la tendencia habitual, es decir, a medida que transcurren los procesos la concentración total de azúcares disminuye.

En el experimento realizado con un flujo de oxígeno de 0,2 vvm (Figura 31 a), la glucosa es la que presenta una mayor velocidad de desaparición, ya que tiene la pendiente más pronunciada, siendo casi vertical entre las 24 y las 30h del proceso. Durante las primeras 30h la concentración de glucosa pasa de ser de 27 g/L a prácticamente agotarse y a partir de este momento su concentración disminuye muy lentamente hasta llegar a terminarse transcurridas 47h.

La fructosa y la celobiosa presentan gráficas similares cuando se introduce en el proceso un flujo de oxígeno de 0,2 vvm. Desde que se inicia el experimento, la concentración de ambas disminuye a una velocidad inferior a la de la glucosa, hasta llegar a las 30h de proceso, a partir de este instante la concentración de celobiosa disminuye muy lentamente, pareciendo casi que se mantiene constante en los 2 g/L hasta finalizar el proceso, mientras que la concentración de fructosa incrementa su velocidad de consumo hasta prácticamente desaparecer a las 36h.

Por su parte, la arabinosa en este mismo proceso aumenta ligeramente su concentración durante las primeras 30h, momento en el que alcanza un máximo de 0,7 g/L, acto seguido su concentración vuelve a disminuir hasta desaparecer completamente a las 47h.

El consumo total de azúcares en este proceso se encuentra en torno al 97,5 %, lo que es casi la totalidad de los carbohidratos existentes al inicio.

En el experimento realizado con un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y sin agitación (Figura 31 b), la concentración de glucosa es la que más rápido disminuye. Inicialmente, baja rápidamente en las 10 primeras horas, entre las 10 y las 24h disminuye, pero a una velocidad mucho menor, para luego volver a descender a una gran velocidad entre las 24 y las 36h. A partir de aquí, su descenso es mucho menos marcado, pasando entre las 36 y las 48h de una concentración de 5 g/L a una de 2 g/L.

Durante las 22h iniciales del proceso, las concentraciones de fructosa y de celobiosa disminuyen progresivamente presentando gráficas idénticas. Posteriormente, la celobiosa dobla prácticamente su concentración en dos horas, alcanzando de nuevo su concentración inicial. A partir de este momento, su concentración disminuye rápidamente pasando de 12 g/L a 2,5 g/L,



ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

aproximadamente, entre las 24 y las 34h. Finalmente su concentración vuelve a sufrir un repunte aumentando desde los 2,5 g/L a 4 g/L al finalizar el proceso.

La fructosa, por su parte, presenta una gráfica con una pendiente muy suave, es decir, su concentración disminuye progresivamente a lo largo de todo el proceso sin experimentar subidas o bajadas bruscas. Dicha concentración pasa de los 12,5 g/L al inicio, a los 3 g/L al final del proceso llegadas las 47h. La concentración de arabinosa se mantiene, aparentemente constante, durante todo el proceso en torno a los 0,5 g/L. El consumo de azúcares totales, en este caso, se encuentra alrededor del 82,5 %.

No se ven grandes diferencias entre ambos experimentos, si bien es cierto que, en el proceso con agitación en el que se introduce un flujo de oxígeno de 0,2 vvm se consume una cantidad de azúcares un 15 % superior a la que se consume en el proceso sin agitación. Además, el consumo de azúcares en el proceso con agitación es casi del 100 %, con lo que se puede afirmar que, el introducir un cierto flujo de oxígeno junto con una agitación del medio favorece el consumo de los carbohidratos presentes.

En este primer proceso con aeración se puede ver (Figura 31 c) como la concentración máxima de 2,3-butanodiol obtenida son 14,15 g/L, se trata de una concentración muy similar a la registrada en los procesos llevados a cabo para determinar la influencia de la carga enzimática, en los que se usaba el mismo reactor con idéntica agitación pero sin aeración, por lo que al menos en este primer ensayo el flujo de oxígeno introducido no influye en la producción de 2,3-butanodiol. De forma análoga al resto de procesos, la concentración de este diol aumenta progresivamente hasta alcanzar el máximo a las 30h, a partir del cual desciende lentamente hasta finalizar el proceso, a las 46 h, con una concentración de 10,90 g/L.

La concentración de etanol también aumenta durante las primeras 30h del experimento llegando hasta los 7 g/L, pasado este tiempo continúa aumentando pero a un ritmo muy lento, tal y como se puede ver en la figura 31 c), hasta finalizar el proceso.

La concentración de acetoína, por el contrario, se mantiene constante durante las 30h iniciales en torno a 1 g/L para, acto seguido, desaparecer casi por completo en un breve período de 2h. Superada esta situación, se puede observar que, su concentración vuelve a aumentar hasta el final del proceso, superando ligeramente su concentración inicial (Figura 31 c).

Como se puede observar en la figura 31 d), en la que aparece representada la obtención de productos del proceso con aeración, en el que se introduce un flujo de oxígeno de 0,7 vvm pero sin agitación, la concentración máxima de 2,3-butanodiol registrada es de 13,12 g/L, ligeramente inferior a la obtenida en el anterior experimento con aeración (0,2 vvm) y agitación (50 rpm), hecho con el que se puede afirmar de nuevo que la agitación no influye demasiado en el proceso. Como se ha comentado en experimentos anteriores, la concentración de 2,3-butanodiol asciende a medida que transcurre el tiempo hasta llegar a su máximo, en este caso a las 31h, a partir de entonces se mantiene constante hasta finalizar el experimento.

Las concentraciones de etanol y de acetoína se mantienen prácticamente constantes durante todo el proceso con aeración y sin agitación, finalizando ambos productos con una concentración muy similar, alrededor de 1,5 g/L. Para la acetoína se puede observar una curva ligeramente convexa, mientras que para el etanol esta curva es ligeramente cóncava (Figura 31 d).





Al comparar estos dos procesos, en lo referente a la obtención de los productos (Figuras 31 c y d), cabe destacar que, la concentración máxima de 2,3-butanodiol obtenida en ambos experimentos es muy similar, aunque levemente superior en el proceso con un flujo de oxígeno de 0,2 vvm y agitación. También se puede decir que, la concentración final de etanol es bastante superior en ese mismo proceso, casi 7 veces superior según los datos numéricos obtenidos de las tablas (Tablas experimentales 11 y 12), mientras que la concentración de acetoína al finalizar los experimentos es muy similar y pequeña en ambos, alrededor de 1,5 g/L.

El hecho de introducir aeración no modifica en gran medida la concentración máxima de 2,3butanodiol obtenida. Por lo visto en todos los experimentos realizados en el reactor de 2 L con un volumen de trabajo de 0,7 L (cuatro experimentos, dos cambiando la carga enzimática y dos introduciendo aeración) la concentración máxima de 2,3-butanodiol apenas varía.



ESCUELA DE INGENIERÍAS

5. Diseño de un biorreactor para el proceso de SSF.

Para llevar a cabo este proceso, se ha seleccionado un biorreactor continuo de tanque agitado, en general estos reactores son equipos cilíndricos con un sistema mecánico de homogenización, como es la agitación, gracias a ella se garantiza la misma composición en cualquier punto del reactor.

El agitador por excelencia es la turbina de disco (Rushton), puesto que tiene bajos esfuerzos cortantes lo que permite conservar la integridad de las células debido a un menor efecto cizalla. Se trata de un impulsor de flujo axial que distribuye la potencia generada por el motor, al que va conectada, a todo el volumen de fluido [22].

La forma de operar en continuo, como su propio nombre indica, es porque existe una corriente de entrada y otra de salida de tal modo que el volumen de líquido en el interior del reactor permanece constante.

Las ventajas más importantes de operar en un biorreactor continuo de tanque agitado son: el aumento de la productividad, la reducción de los costes de operación (mano de obra y energía), el mayor control del proceso y la poca fluctuación en la concentración del sustrato, del microorganismo y del producto. Sin embargo, este tipo de biorreactores también llevan asociadas ciertas desventajas, como son: una mayor probabilidad de contaminación, posibilidad de pérdida de calidad en el producto y coste de adquisición elevado [22].



Figura 32: Esquema básico de un biorreactor continuo de tanque agitado [22].

Conocer las dimensiones y características del biorreactor resulta clave para poder desarrollar eficientemente el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Para ello, se han utilizado los siguientes datos de partida:

- Los parámetros cinéticos de la Tabla 9.
- El tiempo hidráulico de residencia que, según los experimentos realizados, ha sido de 48 horas.





- El flujo volumétrico de alimentación al biorreactor, que es de 4,2 L/h de destrío de zanahoria al 10% m/v.
- La concentración inicial de sustrato (azúcares totales) con la que se actúa, en este caso 55 g/L.

Una vez que se tienen todos estos datos de partida, se procede a plantear el balance de materia a las células y el balance de materia al producto, sabiendo que se trata de un biorreactor continuo de tanque agitado, con el fin de comprobar que los datos experimentales obtenidos en el laboratorio no difieren en gran medida de los obtenidos de forma matemática.

5.1. Balance de materia a las células.

Con el balance de materia siguiente se puede hallar la concentración de sustrato al finalizar el proceso de SSF y comprobar así si el resultado dista poco del obtenido experimentalmente en el laboratorio.

$$D * x = \frac{\mu_m * S}{K_s + S} * x * \left(1 - \frac{S}{S^*}\right)^n \qquad Ecuación 11$$

donde D es la velocidad de dilución (h⁻¹), X la concentración final de células (g/L), μ m la velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹), S la concentración final de sustrato (g/L), Ks la constante de Monod o constante de saturación del sustrato (g/L), S* la concentración de sustrato para la que no hay crecimiento celular (g/L) y n es el grado de inhibición por sustrato.

Aplicando el balance de materia a las células (Ecuación 11), y conociendo el valor de cada uno de los parámetros implicados en dicho balance, se obtiene el valor de S:

$$D = \frac{1}{THR} = \frac{1}{48 h} \rightarrow D = 0,021 h^{10}$$
$$\mu m = 0,641 h^{-1}$$
$$Ks = 2,574 g/L$$
$$S^{*} = 228 g/L$$
$$n = 0,39$$
$$S = 0,087 g/L$$

La concentración final de sustrato calculada de forma matemática no es muy diferente a la obtenida de forma experimental, por lo que se puede dar por buena la aplicación de dicho balance y el valor de los parámetros empleados.

A continuación, se calcula el rendimiento celular del proceso con la Ecuación 12, para ello el valor de los parámetros X y S se obtienen de la Tabla experimental 1, mientras que X_0 es 0 y S_0 es un dato de partida:

$$X = 3,78 \ g/L$$





$$S = 3,15 g/L$$
$$X_0 = 0 g/L$$
$$S_0 = 55 g/L$$

donde X₀ y S₀ son la concentración de células y de sustrato (g/L), respectivamente, al inicio del proceso, mientras que Yxs es el coeficiente de rendimiento celular.

$$Y_{xs} = \frac{x - x_0}{s_0 - s}$$
 Ecuación 12
$$Y_{xs} = 0,073$$

Una vez sacado el resultado de Y_{xs} , se calcula la concentración celular al finalizar el proceso, aplicando la Ecuación 12 y sabiendo que:

$$Y_{xs} = 0,073$$

$$S = 0,087 \frac{g}{L} (del \ balance \ de \ materia \ a \ las \ células)$$

$$S_0 = 55 \ g/L$$

$$X_0 = 0 \ g/L$$

$$X = 4,003 \ g/L$$

De la misma forma que ocurre con la concentración final de sustrato (S), la concentración final de células (X) cambia poco respecto de la obtenida experimentalmente en el laboratorio.

5.2. Balance de materia al producto.

Al igual que se ha hecho con el sustrato y las células, se calcula la concentración de producto (P), 2,3-BDO, al finalizar el proceso. Para ello se realiza el balance de materia al producto que aparece expresado en la Ecuación 13, sin embargo, se debe de calcular primeramente $Y_{PS.}$

$$D * P = \frac{Y_{PS}}{Y_{XS}} * X * \frac{\mu_m * S}{K_s + S} * \left(1 - \frac{S}{S*}\right)^n \qquad Ecuación 13$$

donde Y_{PS} es el rendimiento del producto respecto del sustrato y se calcula como:

$$Y_{PS} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \qquad Ecuación \, 14$$

la concentración final de producto (P) y de sustrato (S) se sacan de la Tabla experimental 1 mientras que, como en casos anteriores, la concentración inicial de sustrato (S_0) es un dato de partida:

$$P = 26,21 \ g/L$$

 $S = 3,15 \ g/L$





$$P_0 = 0 g/L$$
$$S_0 = 55 g/L$$
$$Y_{PS} = 0,505$$

Una vez calculado el coeficiente de rendimiento del producto respecto del sustrato (Y_{PS}), se aplica el balance de materia al producto (Ecuación 13) para hallar la concentración final de producto (P), en el que se utilizan los siguientes valores ya conocidos:

$$D = \frac{1}{THR} = \frac{1}{48 h} \rightarrow D = 0,021 h^{10}$$

$$\mu m = 0,641 h^{-1}$$

$$Ks = 2,574 g/L$$

$$S^{*} = 228 g/L$$

$$n = 0,39$$

$$S = 0,087 g/L$$

$$X = 4,003 g/L$$

$$Y_{xs} = 0,073$$

$$Y_{PS} = 0,505$$

$$P = 27,764 g/L$$

Tal y como sucede con la concentración final de sustrato (S) y la concentración final de células (X), la concentración final de producto (P), calculada matemáticamente con la aplicación del balance de materia al producto, apenas varía respecto de la obtenida experimentalmente en el laboratorio.

5.3. Cálculo de las dimensiones del reactor.

Para calcular las dimensiones del reactor se toma como referencia el tiempo hidráulico de residencia (THR), en este caso, tal y como se ha comprobado en el laboratorio, son 48 horas. A partir de este valor se calcula el volumen ocupado por el fluido de trabajo en el reactor.

$$D = \frac{1}{THR} = \frac{1}{48 h} = 0,021 h^{-1}$$
$$D = \frac{\tilde{V}}{V_{ocupado}} \rightarrow V_{ocupado} = \frac{\tilde{V}}{D} = \frac{4,2 L/h}{0,021 h^{-1}} \rightarrow V_{ocupado} = 201, 6 L = 0,202 m^3$$

Una vez conocido el volumen ocupado en el interior del reactor se puede calcular su diámetro y su altura, realizando la suposición de que D = H, de esta forma:

$$V_{ocupado} = \pi * \frac{D^2}{4} * D \qquad Ecuación 15$$





Por lo que se obtiene la siguiente altura y diámetro del reactor:

$$D = H = 0,635 m$$

Por cuestiones de diseño, puesto que el volumen total del reactor debe de ser superior al volumen ocupado por el líquido de trabajo, se sobredimensiona la altura de éste en un 50 %, por lo que la altura y el diámetro definitivos son:

$$H = 1,5 * 0,635 \rightarrow H = 0,953 m$$

 $D = 0.635 m$

Finalmente, el volumen total del biorreactor se calcula empleando la Ecuación 15, donde la altura y el diámetro tendrán los valores anteriormente calculados:

$$V_{tot} = \pi * \frac{D^2}{4} * H = \pi * \frac{0.635^2}{4} * 0.953 \rightarrow V_{tot} = 0.302 \ m^3$$

Una vez realizados los cálculos anteriores, se elabora un análisis de una serie de parámetros y elementos presentes en los biorreactores. Debido a las dimensiones de éste, se ha optado por colocar como impulsores dos turbinas de disco (Rushton) a lo largo del mismo eje, asegurando así la agitación por igual en cada uno de los puntos del biorreactor, este tipo de turbinas son sencillas y fácilmente intercambiables. Además, dispone de varios deflectores (en nuestro caso 4), localizados a lo largo del perímetro del reactor con objeto de incrementar la turbulencia. El aire estéril se introduce por la base del tanque.

A continuación, conociendo el diámetro del biorreactor (D, de aquí en adelante T), y con las relaciones geométricas estándar existentes en la Tabla 10, se procede a su dimensionado interno:





El número de álabes (n), tal y como se indica en la tabla anterior, será de 6 en cada una de las turbinas de disco que presenta el biorreactor.





El diámetro de los impulsores será un tercio del diámetro del tanque:

$$D_{imp} = \frac{T}{3} \qquad \qquad Ecuación \ 16$$

$$D_{imp} = 0,212 m$$

El primero de los impulsores se situará a una distancia C del fondo, por lo tanto, se encontrará a la siguiente altura respecto de la base del biorreactor:

$$C = \frac{T}{3}$$
 Ecuación 17

donde T, como se ha comentado anteriormente corresponde al valor del diámetro del biorreactor (m).

$$C = 0,212 m$$

Los dos impulsores estarán separados por una distancia (d) entre ellos, que será 1/3 de la altura ocupada por el fluido, por tanto:

$$d = \frac{H}{3}$$
 Ecuación 18

$$d = 0,212 m$$

El primer impulsor, más cercano al fondo del recipiente, se encontrará a una distancia (S) respecto de la superficie del fluido, esta será:

$$S = \frac{2T}{3}$$
 Ecuación 19
$$S = 0,424 m$$

Una vez calculadas todas estas alturas y distancias, se puede conocer la distancia (S_1) existente entre el segundo impulsor y la superficie del fluido. Para ello es necesario realizar la siguiente operación:

$$S_1 = H - C - d$$
 Ecuación 20
 $S_1 = 0, 212 m$

El grosor de cada una de las turbinas de disco (W) debe de ser cinco veces inferior a su diámetro de impulsión, mientras que la longitud (L) de cada uno de los álabes que componen las turbinas de disco tiene que ser 4 veces inferior al diámetro de impulsión, por ello:

$$W = \frac{D_{imp}}{5}$$

$$L = \frac{D_{imp}}{4}$$

$$W = 0,042 m$$
Ecuación 22

L = 0,053 m

51





La separación entre la pared del recipiente y cada una de las placas deflectoras es de 1/60 el diámetro del biorreactor, por ello:

$$S_b = \frac{T}{60}$$

Ecuación 23

 $S_b = 0,011 m$

Por último, la anchura de las placas deflectoras deben de ser 1/12 del diámetro del tanque:

$$W_b = \frac{T}{12} \qquad \qquad Ecuación 24$$

 $W_b = 0,053 m$

A continuación se elabora una tabla resumen de las dimensiones del biorreactor:

Tabla 11: Dimensiones calculadas del biorreactor diseñado.

	Nb	Wb (m)	Sb (m)	Dimp (m)	C (m)	S (m)	H (m)	n	W (m)	L (m)
Turbina de	4	0,053	0,011	0,212	0,212	0,424	0,635	6	0,042	0,053
disco										

5.4. Necesidades de potencia para la agitación del sistema.

En este apartado se va a calcular la potencia necesaria para agitar correctamente el sistema, tanto no aireado como aireado, para ello se van a utilizar, por las dimensiones del biorreactor, dos turbinas de disco situadas en el mismo eje, tal y como se ha procedido a comentar en apartados anteriores. Se parten de los siguientes datos:

- Viscosidad del medio: $\mu = 0.01$ Kg/ms.
- Densidad del medio: $\rho = 1100 \text{ Kg/m}^3$.
- Velocidad de agitación: N = 50 rpm.
- Volumen útil del biorreactor: V = 0,202 m³.
- Diámetro del biorreactor: D_t = 0,635 m.
- Aeración 0,2 vvm.

5.4.1. Potencia del sistema de agitación sin aeración.

La potencia absorbida durante la agitación del sistema se representa a través de números adimensionales, como es el número de potencia (Np), y que para sistemas no aireados se puede correlacionar con el Reynolds (Re).

Para el cálculo de la potencia se debe conocer primero el diámetro impulsor (Da), gracias al cual se puede obtener el número de Reynolds:

$$Da = \frac{D_t}{3}$$
 Ecuación 25





$$Re = \frac{Da^2 * N * \rho}{\mu}$$

Ecuación 26

Donde Da es el diámetro impulsor (m), D_t es el diámetro del biorreactor (m), N es la velocidad de agitación (s⁻¹), ρ la densidad del fluido (Kg/m³) y μ la viscosidad del fluido (Kg/ms). Según las Ecuaciones 25 y 26, y los datos existentes al inicio del Apartado 5.4. se obtienen los siguientes resultados:

$$Da = 0,212 m$$

 $Re = 4113,8$

Una vez hallado el valor de Re, se acude a la gráfica presente en la Figura 33, que relaciona el número de potencia (Np) con el Reynolds (Re), obteniéndose de esta forma el número de potencia.





$$Np = 4,5$$

Finalmente, se calcula la potencia de agitación (P) a través de la Ecuación 27:

$$Np = \frac{P}{\rho * N^3 * Da^5}$$
 Ecuación 27
$$P = 1,22 W$$

Tal y como se ha comentado al inicio del apartado, ante las dimensiones del biorreactor, se ha optado por colocar dos turbinas de disco en el mismo eje, por lo que la potencia anteriormente calculada se duplicará, siendo la potencia final del sistema no aireado:

P=2,44W

5.4.2. Potencia del sistema de agitación con aeración.

Al introducir un gas, las necesidades de potencia para su agitación disminuyen debido a:

• Disminución de la densidad del medio.



ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

- Disminución de la viscosidad del medio.
- Aparición de burbujas.

El oxígeno se suministra de forma continua al reactor, asegurando así la actividad celular. Este oxígeno debe transferirse desde la fase gas hasta la fase líquida, y en esta última ser utilizado por los microorganismos que se encuentran en el medio.

La fase gas es la burbuja de aire que va ascendiendo por el reactor, ya que la corriente de aire introducida a éste se debe de hacer por la parte inferior del biorreactor, así recorre toda su longitud y se asegura la transferencia a la fase líquida.

Para el cálculo de las necesidades de potencia en sistemas aireados, se define un módulo adimensional que es el número de aeración, y que representa el grado de dispersión de las burbujas en los alrededores del impulsor. Para ello se aplican las siguientes ecuaciones:

$$Qg = \frac{vvm}{60} * V$$

$$Ecuación 28$$

$$Na = \frac{Qg}{N * Da^3}$$

$$Ecuación 29$$

donde Qg es el caudal de gas (m³/s), vvm es la aeración (vvm), V es el volumen de fluido en el biorreactor (m³), Na es el número de aeración, N la velocidad de agitación (s⁻¹) y Da el diámetro impulsor (m).

$$Qg = 0,000672 \ m^3/s$$

 $Na = 0,085$

Una vez calculado el número de aeración (Na) se acude a la Figura 34, de donde se saca el número de potencia (Np).





$$Np = 1.8$$

Finalmente, se halla la potencia de agitación a través de la Ecuación 30:





 $Np = \frac{Pg}{\rho * Na^3 * Da^5}$

Ecuación 30

Pg = 0,49 W

Tal y como pasaba para la potencia de agitación en un sistema no aireado, se opta por colocar dos turbinas de disco en el mismo eje, por lo que el valor de la potencia calculada Pg se duplicará, siendo la potencia final del sistema aireado:

Pg = 0,98 W

Un parámetro característico de los sistemas aireados es el hold up o retención de la fase gas (¿g). Para su cálculo se procede a aplicar la Ecuación 31:

$$\frac{Pg}{P} = (1 - \varepsilon g) \qquad Ecuación 31$$

$$\epsilon g = 0,60$$

donde Pg es la potencia de agitación en el sistema aireado (W), P es la potencia de agitación en el sistema sin aeración (W) y Eg es el hold up (adimensional).

5.5. Nivel térmico.

En este apartado el objetivo es calcular el calor intercambiado entre el biorreactor y el encamisado para posteriormente hallar la superficie de intercambio de calor. Para ello se aplica un balance global de energía [23], donde la expresión general queda de la siguiente forma:

$$q_{met} + q_{agit} + q_{gas} = q_{ac} + q_{inter} + q_{evap} + q_{sen}$$
 Ecuación 32

donde q_{met} es el flujo de calor relacionado con el crecimiento y el mantenimiento celular (W), q_{agit} es el flujo de calor generado por la agitación del sistema (W), q_{gas} es el calor provocado por el aporte de gases debido a la aeración (W), q_{ac} se trata de la acumulación de calor (W), q_{inter} se trata del flujo de calor intercambiado entre el sistema y los alrededores (W), q_{evap} es el calor debido a las pérdidas por evaporación (W) y q_{sen} es el flujo de calor convectivo/sensible (W).

A continuación se procede a calcular cada uno de los flujos de calor [23]:

• Para el cálculo de q_{met} se aplica la siguiente expresión:

$$q_{met} = V_{biorreactor} * X * \mu * \frac{1}{Y_{\Delta}} \qquad Ecuación 33$$

donde V_{biorreactor} es el volumen ocupado por el fluido en el biorreactor (L), X es la concentración celular al finalizar el proceso (g/L), μ es la velocidad específica de crecimiento máxima (h⁻¹) y Y_Δ es el coeficiente de generación de calor (gcel/kcal) el cual tiene un valor determinado para cada tipo sustrato (en este caso se selecciona el valor típico para un azúcar simple, glucosa).





Tabla 12: Datos empleados para el cálculo de qmet.

V _{biorreactor} (L)	X (g/L)	μ (h⁻¹)	Y _∆ glucosa (gcel/kcal)
201,6	4,003	0,641	0,42

$q_{met} = 1432, 52 W$

• El cálculo de q_{agit} coincide con la potencia de agitación calculada en el Apartado 5.4.2. para sistemas con aeración. En este caso:

$$q_{agit} = 0,98 W$$

• Para conocer el calor el flujo de calor debido a la aeración q_{gas} se desarrolla la siguiente expresión:

$$q_{gas} = \dot{m} * C_p * \Delta T$$
 Ecuación 34
 $\dot{m} = Q_g * \rho_g$ Ecuación 35

donde m es el flujo másico de aire que se introduce (g/s), C_p es el calor específico del aire (J/g°C), ΔT es el incremento de temperatura del aire, Qg es el caudal de aire que se introduce al biorreactor (m³/s) y ρ_g es la densidad de ese aire (g/m³).

Tabla 13: Datos empleados para el cálculo de qgas.

Q _g (m ³ /s)	ρ _g (g/m³)	C _p (J/g°C)	ΔT (°C)
0,000672	1200	1	19

$q_{gas} = 15, 32 W$

 Para conocer el flujo de calor debido a las pérdidas por evaporación se lleva a cabo la siguiente expresión:

$$q_{evap} = M_v * \Delta H_v$$
 Ecuación 36

donde M_v es el flujo másico de fluido que se evapora (Kg/s) y ΔH_v es el calor latente de vaporización (Kj/Kg) a 37°C, que es la temperatura a la que ocurre el proceso de SSF en el biorreactor.

Suponiendo que a 37°C sólo se evapora agua en el proceso, y que el aire se encuentra saturado con vapor de agua, se procede de la siguiente forma:

$$y_{H_2O,\nu} = \frac{P^\circ}{P_T}$$

Ecuación 37

$$M_{\nu} = y_{H_2O,\nu} * Q_g * \rho_g$$

Ecuación 38

Tabla 14: Datos	para	el cálculo	de aevap	a 37°C.
	p	0. 00.00.00	ac gerap	

P°(atm)	P _⊤ (atm)	$Q_g (m^3/s)$	ρ _g (Kg/m³)	ΔH _v (Kj/Kg)
0,04	1	0,000672	1,2	2500





Aplicando la Ecuación 37 y la Ecuación 38 se obtienen unos valores de:

$$y_{H_2 0,v} = 0.04$$

 $M_v = 3.226 * 10^{-5} Kg/s$

Finalmente, actuando con la Ecuación 36 se obtiene el valor del q_{evap} en el proceso:

$$q_{evap} = 80, 64 W$$

• El flujo de calor debido a la acumulación es cero, ya que se trata de un biorreactor adiabático.

$$q_{ac} = 0 W$$

• Por su parte, el flujo de calor sensible también será de 0 W ya que se opera en estado estacionario, donde el volumen total dentro del recipiente durante el proceso no varía al no haber entradas ni salidas.

$$q_{sen} = 0 W$$

Una vez calculados todos los calores puestos en juego, se procede a aplicar la Ecuación 32 del balance global de energía, de donde se obtiene el calor intercambiado:

$q_{inter} = 1368, 18 W$

Una vez conocido el flujo de calor intercambiado por el sistema es posible calcular la superficie del encamisado. Para ello es necesario conocer los siguientes datos:

Variable	Valor
Calor intercambiado (q _{inter})	1368,18 W
Coeficiente global de transmisión de calor (U)	400 W/m ^{2°} C
Diámetro del biorreactor (D)	0,635 m
Altura ocupada en el biorreactor (H)	0,635 m
Temperatura de entrada del agua de refrigeración (T _e)	14°C
Temperatura de salida del agua de refrigaeracón (T _s)	37°C
Incremento de temperatura del agua de refrigeración (ΔT)	23°C

Tabla 15: Datos empleados para el cálculo de la superficie del encamisado.

El coeficiente global de transmisión de calor debe de ser entre 100 y 600 W/m^{2°}C [23], habiéndose elegido un valor intermedio, ya que no existe ningún requisito más para su elección.

Por su parte, el agua que llega al encamisado procede de la red general, por lo que se ha supuesto una temperatura constante de 14°C, sabiendo que en función de la estación del año puede sufrir modificaciones.

La superficie máxima que puede tener el encamisado se expresa en la siguiente ecuación:

$$S = \pi * D * H$$
 Ecuación 39

donde D y H son el diámetro y la altura ocupada por el fluido en el biorreactor.

$$S = 1,269 m^2$$





Finalmente, se procede a calcular el área del encamisado con la Ecuación 39 y utilizando los parámetros presentados en la Tabla 15:

$$S_{enc} = \frac{q_{inter}}{U * \Delta T}$$

Ecuación 40

$$S_{enc} = 0,149 \ m^2$$

A la vista del resultado obtenido, se puede concluir que colocar un encamisado en el reactor es la mejor opción para su refrigeración, ya que dicho área es inferior a la superficie lateral del biorreactor. Si esto no hubiera sido posible, habría que haber estudiado la forma de introducir un serpentín.





6. Impacto ambiental.

El dióxido de carbono que el biorreactor emite a la atmósfera es la principal causa de impacto ambiental que se ocasiona en este proyecto. Estas emisiones pueden provocar un mayor calentamiento global. Para ello, se calcula el CO₂ que es emitido por el biorreactor anualmente, sabiendo que trabaja 300 días y 24 horas al día. En este proyecto se tienen en cuenta tanto las emisiones de CO₂ que genera la potencia ejercida por el sistema de agitación, como las emisiones de dióxido de carbono producidas en el propio proceso de obtención del 2,3butanodiol.

Para el sistema de agitación actual se emplea un motor capaz de desarrollar una potencia de 1,5 KW.

Según la Oficina Catalana del Cambio Climático [24], por cada KWh de consumo eléctrico, se generan 267 g CO₂. Por ello:

10.800 *KWh* *
$$\frac{267 \ g \ CO_2}{KWh}$$
 = **2883**, **6** *Kg CO*₂/*a*ñ*o*

El uso del biorreactor durante un año tendrá un impacto sobre el calentamiento global de 2883,6 Kg CO₂.

Por su parte, en el proceso de obtención del 2,3-butanodiol a partir de carbohidratos como la glucosa, es necesario conocer la estequiometría de la reacción para calcular los Kg de CO₂ emitidos. En este caso:

$$5 C_6 H_{12} O_6 \rightarrow 6 C_4 H_{10} O_2 + 6 C O_2 + 3 O_2$$

Por ello, según la estequiometría, por cada 5 moles de glucosa que se consumen se generan 6 moles de CO₂, sabiendo que en este proceso se parte de una concentración de glucosa de 24,11 g/L (Tabla experimental 1) y se tiene, según los datos iniciales de diseño, un flujo de entrada de 4,2 L/h de fluido y que el biorreactor trabaja durante 24 horas al día 300 días al año:

$$m_{glucosa} = 24,11 \frac{g}{L} * 4,2 \frac{L}{h} * 24h * 300 = 729086,4 g$$
$$m_{CO2} = 729086,4 g Gl * \frac{1 \mod Gl}{180,16 g Gl} * \frac{6 \mod CO_2}{5 \mod Gl} * \frac{44 g CO_2}{1 \mod CO_2} * \frac{1 Kg}{1000 g}$$
$$= 213,68 Kg CO_2/año$$

Por lo que, debido a la obtención de 2,3-butanodiol a partir de la reacción química que ocurre en el biorreactor, se generan anualmente 213,68 Kg de CO_{2.}

Finalmente, para conocer la cantidad total de dióxido de carbono que se emite anualmente a la atmósfera al desarrollar este proceso se deben de sumar ambos resultados:

$$m_{CO2} = 2883,6 + 213,68 = 3097,28 \, Kg \, CO_2/a$$
ño





Como resultado del proceso, en un año de trabajo del biorreactor se emitirán a la atmósfera 3097,28 Kg de CO_2 . Las emisiones promedio de CO_2 de un automóvil a nivel mundial, en 2022, han sido aproximadamente entre 1500 y 2500 Kg/año, por lo que se puede decir que el biorreactor diseñado contamina ligeramente más que un automóvil [25].





7. Estudio económico.

El estudio económico de un proyecto es un análisis que se realiza para determinar la viabilidad y la rentabilidad financiera de una inversión, en este caso el biorreactor diseñado. Se trata de una parte muy importante de todos los proyectos, ya que es necesario determinar sus costes para conocer si se dispone del capital necesario para llevarlo a cabo.

El estudio que se realiza es orientativo para una planta piloto, de forma que, si se desea desarrollar el proyecto a nivel de producción industrial o en cadena el resultado variará, ya que se debería de realizar un análisis más detallado.

Para evaluar el coste total de la realización del proyecto, se ha dividido en dos partes, la primera de ellas agrupa todo lo relacionado con el coste económico del equipo, mientras que en la segunda parte se presenta el coste de la ingeniería [26].

7.1. Coste económico del equipo.

En estos costes se han incluido todos los componentes de los que dispone el biorreactor propuesto en el proyecto. A continuación, se presenta la Tabla 16:

				1	
	Componente	Precio (€)	uds	Cantidad	Precio total (€)
	Depósito AC316 (grosor 3mm)	45	€/Kg	97,53	4388,50
Biorreactor	Tapa superior AC316 (grosor 3mm)	45	€/Kg	21,97	988,65
	Deflectores	45	€/Kg	0,35	15,75
	Mariposas	5	€/ud	8	40
Tornillería	Roscas	1,7	€/ud	8	13,60
	Juntas Viton	5,10	€/ud	8	40,80
	Válvula de bolas	96,70	€/ud	2	193,40
	Motor 1,5 KW	300	€/ud	1	300
	Agitador Rushton	130	€/ud	2	260
Sistemas extras	Aireador	230	€/ud	1	230
	Bomba	67,04	€/ud	2	134,08
	Compresor de aire	247,99	€/ud	1	247,99
	Sistema de refrigeración	535,39	€/ud	1	535,39
	pH-metro	155	€/ud	1	155
Sistemas de control	Termómetro	275	€/ud	1	275
	Sistema de agitación	172,25	€/ud	1	172,25
	Software	1545	€/ud	1	1545
TOTAL					9535,41

Tabla 16:	Coste	económico	del	eauipo.
100/0 10.	00510	ccomonnico	aci	equipe.





Según se ha especificado en la Tabla 16, el coste económico del equipo asociado a este proyecto asciende a 9535,41 euros.

7.2. Coste económico de ingeniería.

En este apartado se abordan los costes de todo aquello que se necesita para desarrollar el proyecto, a excepción de los materiales y elementos que ya se encuentran descritos en el apartado anterior.

Actividad	Precio (€/h)	Cantidad (h)	Total (€)
Estudio previo y documentación	12	70	840
Diseño y cálculos	20	325	6500
Análisis de resultados	15	120	1800
Gastos generales (agua, luz)	/	/	365
TOTAL			9505

Tabla 17: Coste económico de ingeniería.

Según se ha especificado en la Tabla 17, el coste económico de ingeniería relacionado con el desarrollo de este proyecto es de 9505 euros.

7.3. Coste económico total.

El coste económico total será la suma del coste económico del equipo y del coste económico de ingeniería, además se añade un 10% para cubrir posibles imprevistos. Una vez realizado esto, se suma un IVA del 21%.

	Total (€)
Coste económico del equipo	9535,41
Coste económico de ingeniería	9505
Subtotal (SIN IVA)	19040,41
Imprevistos (10%)	1904,04
IVA (21%)	4398,34
COSTE TOTAL DEL PROYECTO	25342,79

Tabla 18: Coste económico total del proyecto.

El coste total del proyecto, una vez sumado el 10% para cubrir posibles imprevistos y aplicado el 21% de IVA, asciende a 25342,79 euros.





8. Conclusiones.

Los ensayos de sacarificación y fermentación simultánea realizados en el laboratorio, empleando como sustrato destrío de zanahoria, Cellic CTec2 y Viscozyme como enzimas y, utilizando como microorganismo *Paenibacillus polymixa*, han proporcionado las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la influencia de la carga enzimática, se ha comprobado que independientemente de la concentración enzimática empleada (5 FPU/g y 10 FPU/g), se consume en el proceso el mismo porcentaje de carbohidratos (94% aproximadamente). La concentración máxima de 2,3-butanodiol obtenida es muy similar (15 g/L), por lo que es suficiente el empleo de una carga de enzimas de 5 FPU/g.
- Con respecto al tipo de impulsor (agitador) utilizado, el consumo de azúcares cuando se emplea una turbina de disco es del 91%, bastante superior al consumo obtenido cuando se utiliza un agitador de hélice (65%), sin embargo, la concentración máxima de 2-3-BDO obtenida es ligeramente mayor con el agitador de hélice (8,7 g/L) que con el agitador de turbina (6,84 g/L), manteniendo en ambos reactores las mismas condiciones de operación en lo referente a agitación, concentración de enzimas y temperatura del proceso.
- En relación con el coeficiente de transporte de oxígeno, se ha comprobado que su valor es constante para valores de aeración inferiores a 0,3 vvm. Por otra parte, un incremento en la velocidad de agitación conlleva un aumento significativo en el coeficiente de transporte de oxígeno cuando la aeración es igual o superior a 0,7 vvm.
- En lo relativo a la introducción de aeración, no se ven grandes diferencias entre ambos experimentos, si bien es cierto que, en el proceso con agitación en el que se introduce un flujo de oxígeno de 0,2 vvm se consume una cantidad de azúcares un 15 % superior al que se consume en el proceso sin agitación y con un flujo de oxígeno de 0,7 vvm (97,5% frente al 82,5%). Además, como el consumo de azúcares en el proceso con agitación es casi del 100 %, se puede afirmar que, el introducir un cierto flujo de oxígeno junto con una agitación del medio favorece el consumo de los carbohidratos presentes. En cuanto a la obtención de 2,3-BDO, el introducir aeración no modifica en gran medida la concentración máxima de 2,3-butanodiol obtenida, (14 g/L aprox).
- Finalmente, en cuanto al tiempo necesario para llevar a cabo el proceso, se ha observado en los experimentos desarrollados que, a partir de las 48 horas se han consumido prácticamente la totalidad de los carbohidratos presentes en el medio, por lo que se establece un tiempo hidráulico de residencia (THR) de 48 horas.

El reactor seleccionado para el proceso ha sido un biorreactor continuo de tanque agitado de acero inoxidable AC316, equipado con un sistema de aeración, sonda de pH y sistema de control de temperatura.

Para el diseño del biorreactor se ha tenido en cuenta el tiempo hidráulico de residencia observado en los experimentos del laboratorio, el cual ha sido de 48 horas. A partir de este parámetro se ha obtenido un volumen de 0,202 m³ (D = 0,635 m y H = 0,953 m). El sistema de agitación está compuesto por un motor de 1,5 KW, dos turbinas de disco (Rushton) con seis álabes cada una de ellas y cuatro deflectores, además la velocidad de agitación para la disolución





es de 50 rpm y el sistema de aeración proporciona 0,2 vvm de aire. El biorreactor se encuentra encamisado con una superficie útil de transmisión de calor de 0,149 m².

Finalmente, se realiza un estudio económico donde se estima que el coste total de la realización del proyecto es de 25342,79 euros.





9. Bibliografía.

Mateo Martínez A. Trabajo Fin de Master 2022. Valoración de residuos hortofrutícolas mediante el desarrollo de procesos de fermentación para la obtención de 2,3-butanodiol. 20,
 Disponible en: <u>https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/55893/TFM-l-</u>2407.pdf?sequence=1. Fecha de consulta 12-10-2023.

[2] Gobierno de España. Cifras del sector hortofrutícola. Disponible en: <u>https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/produccionesagricolas/cifrasdelsectordefruta</u><u>syhortalizasactualizadoa2021 tcm30-628724.pdf</u>. Fecha de consulta 31-10-2023.

[3] Estado mundial de la agricultura y alimentación 2019. Disponible en: <u>https://www.fao.org/3/ca6030es/ca6030es.pdf</u>. Fecha de consulta 31-10-2023.

[4] Desperdicio de frutas y hortalizas. Disponible en: https://gastronomiaycia.republica.com/2018/08/14/los-consumidores-de-la-ue-desperdicianmiles-de-millones-de-kilos-de-frutas-y-verduras-al-ano/. Fecha de consulta 2-11-2023.

[5] Origen, variedades y características de la zanahoria. Disponible en: <u>https://www.bilcosa.es/catalogo/zanahoria/</u>. Fecha de consulta 18-05-2023.

[6] Propiedades de la zanahoria. Disponible en: <u>https://www.mentta.com/blog/propiedades-</u> <u>de-las-zanahorias/</u>. Fecha de consulta 18-05-2023.

[7] Cabrillana M. L. Tesis doctoral, Mendoza 2012. Snack saludable: zanahoria mínimamente procesada. Disponible en: <u>https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos digitales/17285/tesis-snack-saludable-zanahoria-minimamente-procesada.pdf</u>. Fecha de consulta: 19-05-2023.

[8] Rodríguez Antolínez A. Trabajo Fin de Grado 2022. Optimización de la etapa de separación de 2,3-BDO en caldos de fermentación mediante extracción líquido-líquido. Disponible en: https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/54327/TFG-l-2285.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Fecha de consulta 25-05-2023.

[9] Rojas Martínez A. M., Segarra Manzano S., Montesinos Paes A., Tortajada Serra M., Ramón Vidal D., Santos Mazorra V. E., Ladero Galán M., García-Ochoa Soria F., Ripoll Morales V., "Proceso para la producción de 2,3-butanodiol mediante cepas mejoradas de *Raoultella planticola*". 23-01-2014. Nº publicación: WO 2014/013330 A2.

[10] Xie S., Li Z., Zhu G., Song W., and Yi C., "Cleaner production and downstream processing of bio-based 2,3-butane-diol: A review", J. Clean. Prod., vol. 343, no. February, p. 131033, 2022.

[11] Mitsui R., Yamada R., Matsumoto T., and Ogino H., "Bioengineering for the industrial production of 2,3-butanediol by the yeast , *Saccharomyces cerevisiae*", World J. Microbiol. Biotechnol., vol. 38, no. 3, pp. 1–12, 2022.

[12] Rosgaard L., Andric P., Dam-Johansen K., Pedersen S., and Meyer A., "Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw". Appl Biochem Biotechnol, 143(1): p. 27-40. 2007.





[13] Danisco US Inc, Accellerase 1500, Cellulase Enzyme Complex for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis., 2009, GENENCOR: USA. p. 2.

[14] Equihua Sánchez M. Tesis doctoral, Mérida (Yucatán) 2013. Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce. Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/695/1/PCER_M_Tesis_2013_Mintzirani_Equihua_S%C3%A1nchez.pdf. Fecha de consulta 07-06-2023.

[15]Estructuradelalmidón.Disponibleen:https://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/almidon.html.Fecha de consulta10-06-2023.

[16] Carbonero Zaldegui P., Bioquímica de las fermentaciones. Complementos de bioquímica.UniversidadPolitécnicadeMadrid.Disponibleen:https://oa.upm.es/55235/1/FERMENTACIONES.pdf.Fecha de consulta 14-06-2023.

[17] Descripción y propiedades del etanol. Disponible en: <u>https://pldistribucion.com.ar/web/producto/alcohol-etilico-</u> <u>etanol/#:~:text=Es%20un%20alcohol%20que%20en,ebullici%C3%B3n%20de%2078.4%20%C2%</u> <u>BOC.</u> Fecha de consulta 18-06-2023.

[18] Sánchez Montero R., Trabajo Fin de Grado, Sevilla 2020. Ingeniería básica de una planta de producción de etanol a partir de gas de síntesis. Disponible en: https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/106151/TFG-3262-

<u>SANCHEZ%20MONTERO.pdf?sequence=1&isAllowed=y</u>. Fecha de consulta 18-06-2023.

[19] Fermentación etílica o alcohólica. Disponible en: <u>https://biologiageologia.com/biologia2/72231_fermentacion_etilica_o_alcoholica.html.</u> Fecha de consulta 21-06-2023.

[20] Gauss W.F., Suzuki S., Takagi M., "Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments". Volume 3990944. Issue 610731 Edited by: Office USPT. USA, Bio Research Center Company Limited; 1976.

[21] Häßler T., Schieder D., Pfaller R., Faulstich M., Sieber V., "Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by Paenibacillus polymyxa DSM 365". Bioresour. Technol. 2012, 124, 237–244.

[22] Argemí M. Proyecto Fin de Carrera. Diseño de un biorreactor para la fabricación de cerveza. Disponible en:

https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/102060/Dise%C3%B10%20de%20biorre actor%20para%20la%20fabricaci%C3%B3n%20de%20la%20cerveza Marta Argem%C3%AD%2 0%283%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Fecha de consulta 05-03-2024.

[23] Ward O.P., "Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos". 1991.

[24] Cálculo de las emisiones de CO₂. Disponible en: <u>http://canviclimatic.gencat.cat/</u>. Fecha de consulta 01-04-2024.





[25] Emisiones de CO₂ en automóviles. Disponible en: <u>https://es.statista.com/grafico/27298/media-de-emisiones-de-co2-de-los-automoviles-a-nivel-mundial/</u>. Fecha de consulta 01-04-2024.

[26] Sastre E. Proyecto Fin de Carrera. Diseño de un biorreactor para la obtención de ácido glicérico por fermentación bacteriana de glicerol. <u>https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/76424/PFC_MEMORIA_ESastre.pdf?seq_uence=1&isAllowed=y</u>. Fecha de consulta 08-04-2024.





10. Anexos.

10.1. Procedimiento llevado a cabo para la obtención de los datos cinéticos.

Para llevar a cabo este experimento y obtener los datos cinéticos del proceso se procede a trabajar con ocho pruebas en ocho matraces de 250 mL cada uno de ellos. Se introduce un volumen de trabajo de 100 mL en cada uno de los cuatro matraces por la mañana, dos de ellos para las pruebas a 10 FPU y otros dos para las pruebas a 5 FPU. Se realiza la misma operación por la tarde con los cuatro matraces restantes.

Primeramente se calcula la cantidad de zanahoria que se necesita picar en cada uno de los matraces, para ello se sabe que es necesario prepara una mezcla del 10% S/L, lo que quiere decir 10 g de zanahoria seca en 100 mL de líquido. Para ello, gracias a un analizador de humedad, se conoce que la humedad de la zanahoria es del 89,8%, por lo que:

 $\frac{100 \text{ g zanahoria húmeda}}{10,2 \text{ g zanahoria seca}} = \frac{X}{10 \text{ g zanahoria seca}}; \quad X = 98,04 \text{ g zanahoria húmeda}$

Se necesita picar e introducir en cada uno de los ocho matraces un total de 98,04 g de zanahoria húmeda.

Hidrólisis enzimática

Hecho esto se prepara los componentes necesarios para la hidrólisis enzimática. Para ello se dispone de dos enzimas:

- Cellic CTec 2, con una actividad de 90 FPU por mL.
- Viscozyme, con una actividad de 54,5 FPU por mL.

Para saber la cantidad de cada una de ellas que se tiene que agregar en cada matraz con la zanahoria realizamos un sencillo cálculo, sabiendo su actividad, y los gramos de zanahoria seca (sustrato) deseados.

• Cellic CTec 2:

➢ 5 FPU/g:

$$\frac{5 FPU}{g sustrato} * 10 g sustrato seco * \frac{1 mL}{90 FPU} = 0,56.$$

> 10 FPU/g:

$$\frac{10 FPU}{g sustrato} * 10 g sustrato seco * \frac{1 mL}{90 FPU} = 1,11 mL (0,56 en dos veces).$$





5 FPU/g:

$$\frac{5 FPU}{g sustrato} * 10 g sustrato seco * \frac{1 mL}{54,5 FPU} = 0,92$$

> 10 FPU/g:

$$\frac{10 FPU}{g \text{ sustrato}} * 10 \text{ g sustrato seco} * \frac{1 \text{ mL}}{54,5 \text{ FPU}} = 1,83 \text{ mL} (0,92 \text{ en dos veces}).$$

A continuación se añadiría el agua necesaria, en este caso:

100 mL Vtotal - 1,11 mL Cellic Ctec2 - 1,83 mL Viscozyme - (98,04 g zanah húm - 10g zanah seca) = 9,02 mL agua para 10 FPU/g
100 mL Vtotal - 0,56 mL Cellic Ctec2 - 0,92 mL Viscozyme - (98,04 g zanah húm - 10g zanah seca) = 10,48 mL agua para 5 FPU/g

Sin embargo, como simultáneamente se va a realizar un proceso de fermentación, no es necesario adicionar agua puesto que se va a añadir, en cada uno de los matraces una disolución de nutrientes, un sistema tampón, y una disolución de inóculo (*Paenibacillus polymyxa*), siendo la suma de estos volúmenes superior a la cantidad de agua necesaria.

Fermentación

El primer paso de la fermentación es disolver los nutrientes (extracto de levadura, MgSO₄ y $((NH_4)_2SO_4)$ en un vaso de 10 mL, con el tampón de KH₂PO₄. Se deben de elaborar ocho disoluciones de nutrientes, una por cada uno de los matraces con zanahoria que se tiene, para ello disolvemos:

• 1 gramos de extracto de levadura.

$$\frac{10 g}{L} * (100 * 10^{-3} L) = 1 g$$

• 0,02 gramos de MgSO₄.

$$\frac{0.2 g}{L} * (100 * 10^{-3} L) = 0.02 g$$

• 0,3 gramos de (NH₄)₂SO₄.

$$\frac{3 g}{L} * (100 * 10^{-3} L) = 0.3 g$$

Una vez disueltos los nutrientes con el tampón de KH₂PO₄ en los vasos de 10 mL, se vierte el contenido de cada vaso en cada uno de los matraces con la zanahoria, a continuación se incorpora también en cada uno de ellos el tampón K₂HPO₄. El objetivo de las disoluciones que actuarán como tampón, es que el pH de la disolución de zanahoria se mantenga en torno a 6.

Durante las dos primeras horas del proceso, es necesario añadir en cada uno de los matraces con la mezcla de trabajo unas gotas de sosa, la cual basificará nuestra disolución, puesto que su





pH desciende transcurrida media hora a 4,8 y transcurrida 1h y 30 minutos a 5,6. Pasadas las dos primeras horas el pH se mantiene constante en el valor de 6.

Las disoluciones tampón empleadas son:

- K₂HPO₄, de la cual se añade en cada matraz 1,32 mL con la ayuda de una pipeta, y en dos veces, 0,66 cada vez.
- KH₂PO₄, de la cual se añade en cada matraz 8,68 mL. En esta disolución tampón, como he dicho anteriormente, se disuelven los nutrientes.

El tercer paso de la fermentación consiste en añadir, en cada matraz con la disolución de trabajo, 0,3 mL de una disolución de elementos traza. Esta disolución se constituye de los siguientes compuestos:

- FeSO₄, con una concentración de 0,4 g/L.
- MnCl₂*4H₂O, cuya concentración es5 g/L.
- ZnSO₄*7H₂O, de concentración 0,1 g/L.
- H₃BO₃, con una concentración de 0,8 g/L.
- CuSO₄*5H₂O, de concentración 0,04 g/L.
- NaMoO₄*2H₂O, cuya concentración es 0,04 g/L.
- Co(NO₃)₂*6H₂O, con una concentración de 0,08 g/L.
- CaCl₂*2H₂O, de concentrción 1 g/L.
- Biotina, cuya concentración es 0,01 g/L.

Finalmente, se añade en cada uno de los matraces de trabajo 10 mL del medio Häβler, que contiene al inóculo cultivado, *Paenibacillus polymyxa*, puesto que se desea que cada matraz tenga un % en volumen de inóculo del 10%, y se tiene un volumen de trabajo de 100 mL.

Nuestro volumen total de trabajo será:

Vtotal = 100mL + 10 mL tampones - 9,02 mL agua que se debe añadir + 0,3 mL traza + 10 mL inóculo; Vtotal = 111,28 mL para 10 FPU

Vtotal = 100mL + 10 mL tampones - 10,48 mL agua que se debe añadir + 0,3 mL traza + 10 mL inóculo; Vtotal = 109,82 mL para 5 FPU

Una vez que se tienen los matraces preparados, (cuatro por la mañana y los otros cuatro por la tarde) se llevan al orbital, dispositivo en el que se encuentran en continua agitación y en el que se fija una velocidad de giro de 200 rpm y una temperatura de 37 °C durante 71 horas. Cada cierto tiempo se toman muestras en distintos eppendorf, tanto de los matraces preparados por la mañana como de los de por la tarde, que se almacenan en una gradilla en el frigorífico del laboratorio.

Tratamiento de las muestras

Pasadas las 71 horas y una vez que se han recogido todas las muestras, se llevan los eppendorf a una centrífuga cuyas condiciones de trabajo son 10 min y 13400 rpm. Finalizado este tiempo se prepara, por cada una de las muestras recogidas una dilución 4, la cual consiste en mezclar





0,3 mL de la muestra con 0,9 mL de agua destilada. Cada una de estas nuevas diluciones se llevan a un vórtex para que queden bien mezcladas y por último, se filtran en unos viales.

Con estos viales se lleva a cabo un proceso cromatográfico, concretamente HPLC, donde como ya se ha comentado en el punto 3.1 la fase móvil es H_2SO_4 diluido 5 mM, el inyector presenta un volumen de inyección de 20 µL y la columna cromatográfica, que es de tipo Aminex H, trabaja a 60 °C con un flujo de 0,6 mL/min. Una vez acabado esta cromatográfía de líquidos se obtienen los resultados, donde se puede ver la concentración que hay, en cada muestra recogida, de azúcares, ácidos y 2,3-butanodiol.

10.2. Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio para el cálculo del coeficiente de transporte de oxígeno.

Una parte muy importante de este trabajo es calcular el coeficiente de transporte de oxígeno, para ello se prepara un medio con un volumen de 700 mL de agua destilada, en el que se disuelven:

• Xilosa.

$$40 \frac{g}{L} * 0,7 L = 28 g$$

 $10 \frac{g}{L} * 0,7 L = 7 g$

• MgSO₄.

Extracto de levadura.

$$0.2 \frac{g}{L} * 0.7 L = 0.14 g$$

• (NH₄)SO₂.

$$3\frac{g}{L} * 0,7 L = 2,1 g$$

A continuación se agita el medio durante cinco minutos para conseguir la completa disolución de los componentes y se vierte el contenido del vaso en el reactor BIOSTAT B plus.

Se calibra la sonda de oxígeno fuera del reactor, de forma manual, donde se introduce que la temperatura del laboratorio son 19 °C. Al finalizar el calibrado, el porcentaje de oxigeno debe de ser de en torno al 100 %. Una vez concluida la calibración se introduce la sonda en el reactor, donde ya se encuentra el medio, y se observa que el porcentaje de oxígeno disminuye rápidamente (en aproximadamente seis minutos el porcentaje de oxígeno en el medio es un 0 %). Cuando se tiene ese 0 % de oxígeno se conecta la entrada y la salida del baño de agua que circulará por la carcasa y se fija su temperatura a 37 °C. A partir de este momento se puede empezar a oxigenar el medio.

Una vez que se empieza a introducir el oxígeno en el reactor se debe de apuntar cual es la concentración de oxígeno en el medio en cada minuto y así calcular de forma correcta el coeficiente de transporte de oxígeno. Este proceso se extiende hasta alcanzar alrededor del 100 % de oxígeno en el medio.


ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Universidad de Valladolid

El coeficiente de transporte de oxígeno se calcula como la pendiente de la recta que se obtiene al representar gráficamente el tiempo (en minutos) en el eje X frente al $Ln\left(1-\left(\frac{Co2}{Co2*}\right)\right)$ en el eje Y.

Donde Co_2^* será la concentración de oxígeno en el equilibrio, la cual se supone como el 100% y Co_2 será la concentración de oxígeno en el medio en cada instante de tiempo.

10.3. Procedimiento llevado a cabo en el laboratorio en cada ensayo SSF en BDTA.

10.3.1. SSF en BDTA de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL a una concentración enzimática de 5 FPU/g y dos palas diferentes (hélice y turbina de disco).

Se realiza el experimento en un BDTA de 500 mL, con un volumen de trabajo de 300 mL. Para llevarlo a cabo, primeramente se pasteuriza, en vacío, a 90 °C durante 20 minutos, y se deja reposar. Esto se hace para evitar la contaminación del medio. Lo siguiente que se debe hacer es conocer la cantidad de zanahoria húmeda que se debe de triturar. Para ello se procede de forma análoga al proceso anterior, sabiendo que en este caso el volumen del reactor es de 500 mL, el volumen de trabajo deseado es de 300 mL y que la humedad de la zanahoria se mantiene en un 89,8%.

 $\frac{100 \text{ g zanahoria húmeda}}{10,2 \text{ g zanahoria seca}} = \frac{X}{30 \text{ g zanahoria seca}}; \quad X = 294,12 \text{ g zanahoria húmeda}$

Por lo que se debe de introducir en el reactor 294,12 g de zanahoria húmeda para llevar a cabo el experimento.

Hidrólisis enzimática

Una vez introducida la zanahoria en el reactor se procede a preparar los componentes necesarios para la hidrólisis enzimática. Para ello se tienen las mismas dos enzimas:

- Cellic CTec 2, con una actividad de 90 FPU por mL.
- Viscozyme, con una actividad de 54,5 FPU por mL.

Para saber la cantidad de cada una de ellas que se tiene que agregar al reactor se realiza un sencillo cálculo, sabiendo su actividad, y los gramos de zanahoria seca (sustrato) deseados. En este caso, se realiza el experimento a una única concentración de 5 FPU.

• Cellic Ctec 2:

➢ 5 FPU/g:

$$\frac{5 FPU}{g sustrato} * 30 g sustrato seco * \frac{1 mL}{90 FPU} = 1,67 mL$$



ESCUELA DE INGENIERÍAS

Universidad de Valladolid

• Viscozyme:

$$\frac{5 FPU}{g sustrato} * 30 g sustrato seco * \frac{1 mL}{54,5 FPU} = 2,75 mL$$

Como simultáneamente se va a proceder a realizar un proceso de fermentación, no es necesario adicionar agua puesto que, como se ha comentado anteriormente, se va a añadir en el reactor una disolución de nutrientes, un sistema tampón, y una disolución de inóculo (*Paenibacillus polymyxa*) siendo la suma de estos volúmenes superior a la cantidad de agua necesaria.

Fermentación

Inicialmente, se disuelven los nutrientes (extracto de levadura, MgSO₄ y ((NH₄)₂SO₄) en un vaso de 50 mL, con los tampones de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , para ello se disuelve el triple de cada uno de los compuestos que en el proceso anterior, puesto que tenemos un volumen de trabajo que es tres veces mayor:

• 3 g de extracto de levadura.

$$\frac{10 g}{L} * (300 * 10^{-3} L) = 3 g$$

• 0,06 g de MgSO₄.

$$\frac{0.2 g}{L} * (300 * 10^{-3} L) = 0.06 g$$

$$\frac{3 g}{L} * (300 * 10^{-3} L) = 0.9 g$$

Una vez disueltos los nutrientes con ambos tampones, se vierte el contenido del vaso en el reactor con la zanahoria. El objetivo de las disoluciones tampón, es el mismo que antes, es decir, que el pH de la disolución de zanahoria se mantenga constante alrededor de 6. Durante las dos primeras horas se ajusta el pH puesto que éste desciende algo, para ello se añade la cantidad necesaria de NaOH 10M hasta que el pH vuelve a 6.

Las disoluciones tampón empleadas, como se ha comentado con anterioridad son:

- K₂HPO₄, de la cual se utiliza 3,96 mL, que se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes con la ayuda de una pipeta de 5 mL.
- KH₂PO₄, de la cual se añade 26,04 mL, que como con el anterior tampón, se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes.

El tercer paso de la fermentación consiste en añadir en el reactor 0,9 mL de una disolución de elementos traza. Esta disolución estará constituida por los mismos compuestos que en experimento anterior de los matraces.

Por último, se adiciona en el reactor 30 mL de la disolución del inóculo cultivado (medio Häβler), *Paenibacillus polymyxa*, puesto que se quiere que tenga un % en volumen del 10%, y se tiene un volumen de trabajo de 300 mL.

Una vez que se ha introducido todo en el reactor, se conecta a él la entrada y la salida de agua que circula por la camisa y se fija a 37 °C la temperatura del baño de agua. A continuación, se





fija la velocidad de giro de la pala (hélice) en 200 rpm. Cada cierto tiempo se toman muestras en distintos tubos de ensayo, que se guardan en el frigorífico, y se mide su pH para seguir la evolución del proceso.

Se observa que durante las primeras 24 horas el pH se mantiene estable alrededor de 5,9. A partir de las 24 horas el medio se acidifica, lo que quiere decir que el proceso se va acercando a su fin. A las 33 horas el pH desciende a 5,4 y finalmente a las 46 horas está por debajo de 5, momento en el que damos por concluido el experimento debido a esa gran caída en el pH de la mezcla existente en el interior.

Tratamiento de las muestras

Pasadas las 46 horas y una vez que se han recogido todas las muestras en los tubos de ensayo y se ha medido su pH, se lleva 1,5 mL de cada una de ellas a sus respectivos eppendorf, éstos se introducen en una centrífuga cuyas condiciones de trabajo siguen siendo 10 min y 13400 rpm. Finalizado este tiempo se prepara, por cada una de las muestras recogidas, una dilución 4, la cual consiste en diluir 0,3 mL de la muestra con 0,9 mL de agua destilada. Cada una de estas nuevas diluciones se llevan a un vórtex, para que queden bien mezcladas, y por último, se filtran en unos viales.

Con estos viales se lleva a cabo el mismo proceso cromatográfico (HPLC) que en el experimento de los matraces, donde la fase móvil sigue siendo H_2SO_4 diluido 5 mM, el inyector presenta un volumen de inyección de 20 μ L y la columna cromatográfica, que es de tipo Aminex H, trabaja también a 60 °C con un flujo de 0,6 mL/min.

Ante los malos resultados obtenidos en la concentración de 2,3-butanodiol en estas muestras (baja concentración), se repite este mismo procedimiento cambiando únicamente la pala del reactor por otra que provoque un menor efecto cizalla (se cambia la hélice por una turbina de disco). Los resultados obtenidos en este caso tampoco son los esperados, el pH de la mezcla desciende conforme a la explicación anterior y a pesar de añadir en repetidas ocasiones NaOH 10 M para evitar la muerte del inóculo (que provoca que se acidifique el medio) es inútil, por lo que desechamos el experimento a las 48 horas.

10.3.2. SSF en BDTA de 2 L con un volumen de trabajo de 700 mL a dos concentraciones enzimáticas diferentes 5 FPU/g y 10 FPU/g.

Ante los malos resultados obtenidos en el proceso anterior con un reactor de 500 mL y un volumen de trabajo de 300 mL se procede a repetir el mismo experimento, pero en este caso empleando un reactor de mayor volumen (2L) y un volumen de trabajo más elevado ($V_{trabajo} = 700$ mL).

En este caso se realiza para dos concentraciones diferentes (5 FPU y 10 FPU, por lo que se necesitan dos reactores). Para llevarlo a cabo, lo primero que se requiere, como en todos los casos anteriores, es conocer la cantidad de zanahoria húmeda que debemos de triturar. Para ello se procede de forma análoga al proceso anterior, sabiendo que en este caso el volumen del reactor es de 2 L, el volumen de trabajo deseado es de 700 mL y que la humedad de la zanahoria se mantiene en un 89,8%.





 $\frac{100 \text{ g zanahoria húmeda}}{10,2 \text{ g zanahoria seca}} = \frac{X}{70 \text{ g zanahoria seca}}; \quad X = 686,28 \text{ g zanahoria húmeda}$

Por lo que se debe de triturar e introducir en cada reactor 686,28 g de zanahoria húmeda para llevar a cabo cada uno de los experimentos.

Hidrólisis enzimática

Una vez introducida la zanahoria en el reactor se procede a preparar los componentes necesarios para la hidrólisis enzimática. Para ello se tienen las mismas enzimas que en los procesos anteriores:

- Cellic CTec 2, con una actividad de 90 FPU por mL.
- Viscozyme, con una actividad de 54,5 FPU por mL.

Para saber la cantidad de cada una de ellas que se tiene que agregar al reactor se realiza un sencillo cálculo, sabiendo su actividad, y los gramos de zanahoria seca (sustrato) deseados. En este caso, como ya se ha mencionado, se realiza el experimento a dos concentraciones diferentes, 5 FPU/g y 10 FPU/g.

• Cellic CTec 2:

$$\sum 5FPU/g = \frac{5FPU}{g \text{ sustrato}} * 70 \text{ g sustrato seco} * \frac{1 \text{ mL}}{90 \text{ FPU}} = 3,89 \text{ mL}$$

$$\sum 10 \text{ FPU/g} = \frac{10 \text{ FPU}}{g \text{ sustrato}} * 70 \text{ g sustrato seco} * \frac{1 \text{ mL}}{90 \text{ FPU}} = 7,77 \text{ mL}$$
• Viscozyme:

$$\sum 5 \text{ FPU/g} = \frac{5 \text{ FPU}}{g \text{ sustrato}} * 70 \text{ g sustrato seco} * \frac{1 \text{ mL}}{54,5 \text{ FPU}} = 6,42 \text{ mL}$$

$$\sum 10 \text{ FPU/g} = \frac{10 \text{ FPU}}{g \text{ sustrato}} * 70 \text{ g sustrato seco} * \frac{1 \text{ mL}}{54,5 \text{ FPU}} = 12,84 \text{ mL}$$

Como simultáneamente se va a realizar un proceso de fermentación, tampoco es necesario adicionar agua en ninguno de los dos experimentos puesto que, como se ha comentado anteriormente, se va a añadir en el reactor una disolución de nutrientes, un sistema tampón, y una disolución de inóculo (*Paenibacillus polymyxa*) siendo la suma de estos volúmenes superior a la cantidad de agua necesaria.

Fermentación

Como en los casos anteriores, se disuelven los nutrientes (extracto de levadura, MgSO₄ y $((NH_4)_2SO_4)$, esta vez en un vaso de 100 mL, con los tampones de KH₂PO₄ y K₂HPO₄. Para ello se





emplean las siguientes cantidades de cada uno de los compuestos y en cada uno de los experimentos:

• 7 g de extracto de levadura.

$$\frac{10 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 7 g$$

0,14 g de MgSO₄.

$$\frac{0.2 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 0.14 g$$

• 2,1 g de (NH₄)₂SO₄.

$$\frac{3 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 2,1 g$$

Las disoluciones tampón empleadas en ambos reactores, como se ha comentado con anterioridad son:

- K₂HPO₄, de la cual se utiliza 9,24 mL, que se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes con la ayuda de una pipeta de 10 mL.
- KH₂PO₄, de la cual se añade 60,76 mL, que como con el anterior tampón, se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes.

Una vez disueltos los nutrientes con ambos tampones, se vierte el contenido del vaso en el reactor con la zanahoria. El objetivo de las disoluciones tampón, es el mismo que hasta ahora, es decir, que el pH de la disolución de zanahoria se mantenga constante alrededor de 6.

El tercer paso de la fermentación consiste en añadir en cada reactor 2,1 mL de una disolución de elementos traza. Esta disolución estará constituida por los mismos compuestos que en los casos anteriores.

Por último, se adiciona en ambos reactores 70 mL del medio Häβler que contiene el inóculo cultivado, *Paeniliacillus polymyxa*, puesto que se quiere tener un % en volumen del 10%, y se tiene un volumen de trabajo de 700 mL en cada uno de ellos.

Los reactores empleados en estos dos casos son del tipo BIOSTAT B Plus, los cuales ajustan a 6 el pH de la mezcla de forma automática, con la adición de NaOH 10 M, ya que como ha ocurrido en el resto de experimentos el pH se acidifica con el paso del tiempo. A medida que avanzan las horas, la cantidad de NaOH que se añade al interior del reactor es mayor. Pasadas 72 horas, damos por concluidos ambos experimentos (5FPU/g y 10 FPU/g) puesto que la cantidad de sosa añadida supera los 100 mL.

Todos estos compuestos que se necesitan para la hidrólisis enzimática y para la fermentación, se adicionan en las cantidades explicadas en los dos experimentos, es decir en dos reactores con un volumen de trabajo de 700 mL, del mismo tipo y en las mismas condiciones, pero cada uno de ellos a una concentración diferente (5 FPU/g y 10 FPU/g).

Una vez que se ha introducido todo en el reactor, se fija a 37 °C la temperatura del baño de agua que circula por la carcasa y se conectan a él la entrada y la salida de agua. A continuación, se fija la velocidad de giro de la pala en 50 rpm, se activa el sensor de pH y se conecta, mediante un tubo de goma flexible, el reactor con el recipiente de sosa que permite subir el pH del medio, la cual es impulsada por una bomba. Cada cierto tiempo se toman muestras en distintos tubos de





ensayo, de las que se apunta su pH para seguir la evolución del proceso, que se almacenan en el frigorífico. Estos dos experimentos se realizan durante 72 horas.

Tratamiento de las muestras

Pasadas las 72 horas y una vez que se han recogido todas las muestras en los tubos de ensayo, se lleva una cantidad de cada una de ellas a sus respectivos eppendorf, y se actúa de la misma forma que en los casos anteriores.

Una vez que tenemos todas las diluciones 4 y tras haberlas filtrado las sometemos al mismo proceso cromatográfico (HPLC).

En ambos experimentos se obtienen unos malos resultados y muy similares en cuanto a la concentración máxima de 2,3-butanodiol, por lo que la concentración enzimática no influye significativamente en la concentración máxima de este alcohol.

Ante estos malos resultados, se ha optado por realizar un último experimento introduciendo aireación (oxígeno) en el reactor.

10.3.3. SSF en BDTA de 2 L con un volumen de trabajo de 700 mL y aeración.

Finalmente se realiza el mismo experimento que en el caso anterior, en un reactor discontinuo de tanque agitado, con un volumen de 2 L y para una concentración de 5 FPU, pero en este caso con la introducción de 0,2 vvm de oxígeno para que el reactor se encuentre aireado en todo momento. Como en todos los casos de los que se ha hablado, se calcula primeramente la cantidad de zanahoria a triturar puesto que conocemos su humedad, ya que se sigue utilizando la misma marca.

 $\frac{100 \text{ g zanahoria húmeda}}{10,2 \text{ g zanahoria seca}} = \frac{X}{70 \text{ g zanahoria seca}}; \quad X = 686,28 \text{ g zanahoria húmeda}$

Por lo tanto, se debe de introducir en el reactor 686,28 gramos de zanahoria picada para realizar el experimento.

Hidrólisis enzimática

Una vez introducida la zanahoria en el reactor se vuelve a preparar, como en ocasiones anteriores, las enzimas empleadas para la hidrólisis enzimática. Éstas son:

- Cellic CTec 2, con una actividad de 90 FPU por mL.
- Viscozyme, con una actividad de 54,5 FPU por mL.

Sabiendo su actividad, y los gramos de zanahoria seca (sustrato) deseados se puede conocer la cantidad de cada una de ellas que es necesario agregar al reactor. En este caso, como ya se ha mencionado, se realiza el experimento a una concentración de 5 FPU/g.





- Cellic CTec 2: $\searrow 5 \text{ FPU/g}$ $\frac{5 \text{ FPU}}{g \text{ sustrato}} * 70 \text{ g sustrato seco } * \frac{1 \text{ mL}}{90 \text{ FPU}} = 3,89 \text{ mL}$
- Viscozyme:

$$\frac{5 FPU}{g sustrato} * 70 g sustrato seco * \frac{1 mL}{54,5 FPU} = 6,42 mL$$

Como en todos los casos anteriores, simultáneamente se va a realizar un proceso de fermentación, por lo que no es necesario adicionar agua en este experimento. Para la fermentación se incorpora al reactor una disolución de nutrientes, un sistema tampón, y una disolución del inóculo (*Paenibacillus polymyxa*) siendo la suma de estos volúmenes superior a la cantidad de agua necesaria.

Fermentación

De forma análoga a los experimentos anteriores, se disuelven los nutrientes (extracto de levadura, MgSO₄ y ((NH₄)₂SO₄), en un vaso de 100 mL, con los tampones de KH₂PO₄ y K₂HPO₄. Para ello se emplean las siguientes cantidades de cada uno de los compuestos:

• 7 g de extracto de levadura.

$$\frac{10 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 7 g$$

• 0,14 g de MgSO₄.

$$\frac{0.2 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 0.14 g$$

2,1 g de (NH₄)₂SO₄.

$$\frac{3 g}{L} * (700 * 10^{-3} L) = 2,1 g$$

Las disoluciones tampón empleadas en este proceso, como se ha comentado con anterioridad son:

- K₂HPO₄, de la cual se utiliza 9,24 mL, que se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes con la ayuda de una pipeta de 10 mL.
- KH₂PO₄, de la cual se añade 60,76 mL, que como con el anterior tampón, se incorporan en el vaso para disolver los nutrientes.

Una vez disueltos los nutrientes con ambos tampones, se vierte el contenido del vaso en el reactor con la zanahoria. Como ya es sabido, el principal objetivo de las disoluciones tampón es que el pH existente en el interior del reactor se mantenga constante alrededor de 6.

Una vez que se incorpora al reactor la disolución constituida por los nutrientes y tampones se añade en él 2,1 mL de una disolución de elementos traza. Esta disolución estará constituida por los mismos componentes que en los casos anteriores.





Por último, se adiciona en el reactor 70 mL de la disolución del inóculo cultivado, *Paenibacillus polymyxa*, puesto que se quiere tener un % en volumen del 10%, y se tiene un volumen de trabajo de trabajo de 700 mL.

El reactor empleado en este caso también es del tipo BIOSTAT B Plus, los cuales ajustan a 6 el pH de la mezcla de forma automática, con la adición de NaOH 10 M, ya que como ha ocurrido en el resto de experimentos el pH se acidifica con el paso del tiempo.

Una vez que se ha introducido todo en el reactor, se conectan a él la entrada y salida del baño de agua que circulará por la carcasa y se fija su temperatura a 37 °C. A continuación, se fija también la velocidad de giro de la pala en 50 rpm, se activa el sensor de pH y se conecta, mediante un tubo de goma flexible, el recipiente de sosa que permite subir el pH del medio, la cual es impulsada por una bomba. Finalmente, se une al reactor la goma por la que se introduce en él el oxígeno, cuyo valor queda fijado en 0,2 vvm.

Cada cierto tiempo se toman muestras en distintos tubos de ensayo, de las que se apunta su pH para seguir la evolución del proceso, y que se almacenan en el frigorífico. Pasadas 46 horas damos por concluido el experimento puesto que, una vez que se llevan las muestras a la máquina de HPLC se observa que los resultados obtenidos son similares a los de semanas anteriores y no se ha visto mejora por el hecho de introducir la aeración, además se confirma la muerte del inóculo.

Se realiza un segundo experimento con aeración el cual consiste, al igual que el primero, en introducir en el reactor 686,28 gramos de zanahoria picada, donde se lleva a cabo una hidrólisis enzimática junto con un proceso de fermentación.

Para la hidrólisis enzimática se emplean las mismas encimas y en las mismas cantidades que en el proceso anterior, a una concentración de 5 FPU. Por su parte, para la fermentación se usan los mismos nutrientes, disoluciones tampón, elementos traza y la disolución del inóculo. Todos ellos en las mismas cantidades, las cuales quedan explicadas unas líneas más arriba, ya que el volumen de trabajo sigue siendo 700 mL. La temperatura del experimento se mantiene en 37 °C.

Las únicas diferencias entre ambos experimentos con aeración son que en el segundo proceso:

- No se incorpora agitación, puesto que la agitación mecánica con la pala puede provocar efecto cizalla y causar la muerte prematura de nuestras células.
- El caudal de oxígeno introducido en este caso se aumenta hasta 0,7 vvm por lo que la aeración es mayor, con ello se intenta que no se consuma todo el oxígeno en el interior del reactor.

Al igual que en todos los procedimientos anteriores se recogen, cada cierto tiempo, muestras en distintos tubos de ensayo, en las que se controla el pH de cada una de ellas. Este segundo proceso de aeración se mantiene durante 46 horas, momento en el que se ve que el pH del reactor ha disminuido considerablemente.





Tratamiento de las muestras

En ambos procesos con aeración, una vez que se han recogido las muestras en los tubos de ensayo, se lleva aproximadamente 1,5 mL de cada una de ellas a sus respectivos eppendorf y se procede como en todos los casos que se han explicado a lo largo del presente proyecto (centrífufa, dilución 4, vórtex, filtración y HPLC).





10.4. Tablas experimentales.

	Ácido galacturónico		Azúcare	es (g/L)		F			
t (h)	(g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	Célula
1	35,87	16,97	24,11	14,04	0,36	0,77	0,76	0,23	
2	29,71	16,55	24,00	14,00	0,22	0,84	0,81	0,51	
3	26,36	16,55	24,21	14,00	0,28	0,71	0,84	0,68	2,33
5	30,22	16,55	27,95	14,05	0,37	0,85	0,98	0,36	
7	22,56	14,37	28,00	13,59	0,34	1,63	0,78	0,71	
8,5	26,90	15,07	28,66	14,01	0,46	2,59	0,83	0,58	
10	21,93	11,79	25,15	12,22	0,36	3,87	0,69	1,16	
15	18,97	11,79	17,74	9,80	0,38	10,07	0,73	2,50	3,80
17	18,69	11,79	16,54	9,51	0,42	11,57	0,72	2,62	
19	18,20	11,79	15,37	9,13	0,45	12,82	0,74	2,81	
21	14,87	6,84	13,85	8,70	0,46	13,66	0,75	2,82	
23	12,47	5,98	11,98	7,96	0,51	15,49	0,75	2,92	4,18
25	17,25	6,00	10,32	7,64	0,59	15,76	0,75	2,97	
27	16,50	6,00	9,00	7,00	0,86	16,99	0,73	2,78	
29	16,52	6,00	7,43	6,69	0,64	17,00	0,61	3,01	
31	14,03	6,00	5,70	5,50	0,96	19,35	0,75	2,81	
33	11,73	5,69	3,89	4,60	0,71	19,97	0,82	3,18	
39	9,97	4,13	0,76	2,72	0,68	23,41	1,50	3,18	4,19
47	12,54	4,13	0,07	2,72	0,68	26,21	1,82	3,01	4,10
65	10,03	2,80	0,00	0,83	0,00	26,21	1,93	2,81	
71	10,83	2,80	0,00	0,35	0,00	26,21	2,76	2,60	3,78
144	10,80	2,80	0,00	0,00	0,00	28,05	3,19	2,01	

Tabla experimental 1: Resultado del proceso de SSF en erlenmeyers a una concentración de 5 FPU/g.

Tabla experimental 2: Resultado del proceso de SSF en erlenmeyers a una concentración de 10 FPU/g.

	Ácido galacturónico		Azúcar	es (g/L)		Pi			
t (h)	(g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	Célula
1	28,93	21,60	30,87	16,08	0,50	0,74	0,77	0,33	
2	24,62	21,60	29,33	13,93	0,30	0,80	0,81	0,49	
3	27,90	21,60	32,75	16,09	0,45	0,71	0,85	0,28	2,16
5	27,07	21,60	35,07	16,30	0,48	0,76	0,92	0,28	
7	26,57	21,60	36,66	16,79	0,58	1,07	1,00	0,34	
8,5	25,94	14,28	36,92	16,77	0,57	1,47	0,90	0,33	
10	25,57	13,80	36,02	16,08	0,74	2,37	0,69	0,44	
15	18,13	14,14	22,59	11,83	0,48	9,04	0,72	2,33	3,13
17	18,19	13,52	21,67	11,70	0,60	10,62	0,71	2,64	
19	17,71	6,67	19,97	11,37	0,55	11,77	0,74	2,74	
21	14,57	6,57	18,74	11,03	0,58	12,82	0,75	2,83	
23	11,70	6,44	16,31	10,43	0,63	14,54	0,78	2,91	4,31
25	12,06	6,04	14,91	10,17	0,66	15,73	0,74	2,99	
27	14,00	7,00	15,50	11,50	0,97	15,73	0,70	2,78	
29	13,00	6,00	15,00	12,00	1,00	15,73	0,72	2,77	
31	15,92	6,00	16,82	11,49	1,00	17,17	0,70	2,87	
33	13,98	6,00	16,43	12,25	1,00	18,06	0,71	2,82	
39	11,78	4,15	3,67	5,51	1,00	22,98	1,12	3,22	4,96
47	13,08	4,00	2,76	4,00	1,00	26,50	1,00	3,34	3,91
65	10,14	2,39	0,00	2,78	0,00	26,20	1,23	2,84	
71	10,96	2,39	0,00	2,88	0,00	26,08	1,20	3,01	2,63
144	10,96	2,39	0,00	2,00	0,00	27,13	2,08	2,37	





t (min)	Co2 (%)	Co2* (%)	Co2/Co2*	1-(Co2/Co2*)	Ln(1-(Co2/Co2*))
0	0	100	0	1	0
1	2,700	100	0,027	0,973	-0,027
2	8,900	100	0,089	0,911	-0,093
3	16,700	100	0,167	0,833	-0,183
4	23,500	100	0,235	0,765	-0,268
5	31,400	100	0,314	0,686	-0,377
6	39,400	100	0,394	0,606	-0,501
7	46,700	100	0,467	0,533	-0,629
8	53,500	100	0,535	0,465	-0,766
9	59,900	100	0,599	0,401	-0,914
10	65,700	100	0,657	0,343	-1,070
11	71,500	100	0,715	0,285	-1,255
12	76,700	100	0,767	0,233	-1,457
13	81,200	100	0,812	0,188	-1,671
14	85,400	100	0,854	0,146	-1,924
15	88,800	100	0,888	0,112	-2,189
16	91,700	100	0,917	0,083	-2,489
17	94,600	100	0,946	0,054	-2,919
18	97,600	100	0,976	0,024	-3,730

Tabla experimental 3: C_{02} y C_{02}^{*} en cada instante de tiempo a un flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 50 rpm.





t (min)	Co2 (%)	Co2* (%)	Co2/Co2*	1-(Co2/Co2*)	Ln(1-(Co2/Co2*))
0	0	100	0	1	0
1	5,500	100	0,055	0,945	-0,057
2	13,900	100	0,139	0,861	-0,150
3	25	100	0,250	0,750	-0,288
4	32,100	100	0,321	0,679	-0,387
5	40,300	100	0,403	0,597	-0,516
6	47,900	100	0,479	0,521	-0,652
7	54,700	100	0,547	0,453	-0,792
8	59,400	100	0,594	0,406	-0,901
9	65,900	100	0,659	0,341	-1,076
10	71,700	100	0,717	0,283	-1,262
11	72,800	100	0,728	0,272	-1,302
12	77,900	100	0,779	0,221	-1,510
13	80,100	100	0,801	0,199	-1,614
14	83,900	100	0,839	0,161	-1,826
15	86,900	100	0,869	0,131	-2,033
16	88,300	100	0,883	0,117	-2,146
17	91,200	100	0,912	0,088	-2,430
18	91,100	100	0,911	0,089	-2,419
19	93	100	0,930	0,070	-2,659
20	94,300	100	0,943	0,057	-2,865
21	95,300	100	0,953	0,047	-3,058
22	95,700	100	0,957	0,043	-3,147
23	97,200	100	0,972	0,028	-3,576
24	96,200	100	0,962	0,038	-3,270
25	96,000	100	0,960	0,040	-3,219
26	95,600	100	0,956	0,044	-3,124
27	95,500	100	0,955	0,045	-3,101

Tabla experimental 4: C_{02} y C_{02}^{*} en cada instante de tiempo a un flujo de oxígeno de 0,2 vvm y 100 rpm.





t (min)	Co2 (%)	Co2* (%)	Co2/Co2*	1-(Co2/Co2*)	Ln(1-(Co2/Co2*))
0	0	100	0	1	0
1	4,200	100	0,042	0,958	-0,043
2	14,800	100	0,148	0,852	-0,160
3	32,300	100	0,323	0,677	-0,390
4	39,700	100	0,397	0,603	-0,506
5	49,100	100	0,491	0,509	-0,675
6	57,200	100	0,572	0,428	-0,849
7	64	100	0,640	0,360	-1,022
8	69,300	100	0,693	0,307	-1,181
9	75,300	100	0,753	0,247	-1,398
10	80,100	100	0,801	0,199	-1,614
11	82,300	100	0,823	0,177	-1,732
12	86,400	100	0,864	0,136	-1,995
13	89,700	100	0,897	0,103	-2,273
14	91,200	100	0,912	0,088	-2,430
15	95,000	100	0,95	0,05	-2,996
16	95,400	100	0,954	0,046	-3,079
17	96,400	100	0,964	0,036	-3,324
18	99,100	100	0,991	0,009	-4,711

Tabla experimental 5: C_{02} y C_{02}^{*} en cada instante de tiempo a un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 50 rpm.

Tabla experimental 6: C_{02} y C_{02} ^{*} en cada instante de tiempo a un flujo de oxígeno de 0,7 vvm y 100 rpm.

t (min)	Co2 (%)	Co2* (%)	Co2/Co2*	1-(Co2/Co2*)	Ln(1-(Co2/Co2*))
0	0	100	0	1	0
1	4	100	0,040	0,960	-0,041
2	14,600	100	0,146	0,854	-0,158
3	29,200	100	0,292	0,708	-0,345
4	43,000	100	0,430	0,570	-0,562
5	56,800	100	0,568	0,432	-0,839
6	68,500	100	0,685	0,315	-1,155
7	77,100	100	0,771	0,229	-1,474
8	86,100	100	0,861	0,139	-1,973
9	92,700	100	0,927	0,073	-2,617
10	98,100	100	0,981	0,019	-3,963

Tabla experimental 7: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 500 mL a 5 FPU/g con la pala de hélice. (Influencia de la pala empleada)

	Ácido		Azúcares (Р	roductos (g/L			
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol
3	20,04	9,46	25,25	14,51	0,27	0,98	0,74	0,49
6,5	19,12	8,28	27,21	15,28	0,40	1,56	0,85	0,49
9	18,65	7,51	27,05	15,15	0,35	2,20	0,86	0,62
22	16,94	3,35	25,66	13,87	0,51	6,82	0,89	1,81
24	16,60	2,90	25,70	14,36	0,68	6,95	0,93	1,80
33	16,44	3,03	17,59	5,36	0,81	8,70	0,91	2,66
46	16,47	2,60	10,79	3,54	0,74	8,39	1,08	3,43





Tabla experimental 8: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 500 mL a 5 FPU/g con la pala de turbina de disco. (Influencia de la pala empleada).

	Ácido		Azúcare	es (g/L)	F	Productos (g/I	-)	
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol
6	17,09	10,87	31,13	16,59	0,32	1,55	0,79	0,36
7,5	16,86	10,50	31,64	16,67	0,41	1,88	0,75	0,54
9	15,85	11,25	31,99	16,68	0,36	2,20	0,79	0,59
22	14,14	4,45	29,32	14,98	0,67	6,84	0,75	2,08
30	14,30	2,44	20,49	4,28	0,86	6,69	0,81	3,33
32,5	12,10	1,97	14,79	4,04	0,68	6,45	0,81	4,70
/18	12 66	2 00	0.00	2.81	0.3/	6.21	0.84	6.83

Tabla experimental 9: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 2 L a 5 FPU/g. (Influencia de la carga enzimática).

	Ácido		Azúcare	es (g/L)			Productos		
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	VNaOh añadida (mL)
9	13,07	6,37	25,39	14,65	0,30	1,91	0,76	0,55	20,00
22	11,33	3,47	16,11	6,93	0,50	10,62	0,90	4,25	40,00
30	10,05	1,77	10,69	3,41	0,53	14,62	0,95	5,77	90,00
31,5	9,89	1,70	10,10	3,17	0,57	14,96	0,93	6,01	90,00
33	10,07	1,64	9,36	2,81	0,55	14,82	0,94	5,96	110,00
48	8,44	0,90	0,95	0,54	0,29	14,70	1,66	7,23	115,00
72	8,56	0,92	0,95	0,59	0,47	13,88	2,91	7,11	115,00

Tabla experimental 10: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 2 L a 10 FPU/g. (influencia de la carga enzimática).

	Ácido		Azúcare	es (g/L)		F	Productos (g/I		
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	VNaOH añadida (mL)
6	17,02	6,23	31,04	16,88	0,53	1,19	0,85	0,40	15,00
9	16,51	5,75	30,80	17,00	0,78	1,73	0,77	0,60	20,00
22	15,17	3,96	23,59	9,09	0,96	9,79	0,94	3,66	43
27	10,90	0,87	15,35	4,25	1,00	12,93	0,93	5,89	48
30	10,61	0,41	4,64	3,63	0,88	14,40	0,95	8,29	92
33	10,68	0,88	1,02	2,81	0,96	14,24	0,96	9,44	118
46	13,40	0,81	0,87	0,87	0,57	13,59	0,95	6,43	118

Tabla experimental 11: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 2 L a 5 FPU/g, 50 rpm y 0,2 vvm de oxígeno. (Influencia de la aeración).

	Ácido		Azúcar	es (g/L)		F	Productos (g/l		
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	VNaOH añadida (mL)
6	19,20	11,25	24,94	15,41	0,24	1,01	0,99	0,42	16,00
9	18,53	11,45	25,54	15,23	0,29	1,67	0,97	0,87	22,00
22	15,98	6,73	15,28	8,07	0,59	10,74	1,18	3,91	53,00
24	15,82	5,40	14,63	7,66	0,58	11,82	1,10	4,45	56,00
30	14,33	2,25	0,61	1,94	0,71	14,15	1,19	6,91	77,00
33	13,04	1,51	0,17	0,61	0,44	12,30	0,52	6,98	80,00
46	11,75	1,01	0,10	0,04	0,07	10,90	1,32	7,11	81,00

Tabla experimental 12: Resultado del proceso de SSF en el reactor de 2 L a 5 FPU/g, 0,7 vvm de oxígeno y sin agitación. (Influencia de la aeración).

	Ácido		Azúcare	es (g/L)		F	Productos (g/I		
t (h)	galacturónico (g/L)	Celobiosa	GLUCOSA	FRUCTOSA	ARABINOSA	BDO	Acetoína	etanol	VNaOH añadida (mL)
6	20,68	12,27	24,75	12,49	0,37	2,54	1,07	1,31	10
9	13,38	10,03	20,22	10,13	0,66	4,58	0,93	2,03	10
22	13,18	6,93	17,48	7,08	0,37	12,18	0,93	2,60	10
24	15,78	11,07	15,41	6,52	0,37	12,84	0,94	2,60	18
31	15,18	3,15	9,12	4,39	0,37	13,12	1,08	2,18	26
33	14,83	2,39	4,66	3,58	0,37	12,98	1,04	2,04	59
46	14,23	3,84	1,63	2,86	0,37	13,01	1,26	1,38	59