



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Transformación de dióxido de carbono en compuestos de interés farmacéutico

Autor:

Campano Méndez, Sergio

Tutores:

Lebrero Fernández, Raquel
Cantera Ruiz de Pellón, Sara

Co-tutor:

Huang-Lin, Elisa

Dep. de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente,

Valladolid, junio 2024.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer la guía y la ayuda en todo momento de Elisa Huang-Lin, co-tutora de este trabajo. Además, también quiero agradecer la ayuda de mis dos tutoras Raquel Lebrero Fernández y Sara Cantera Ruiz de Pellón.

También quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana, Marina, por confiar siempre en mí.

Por último, quiero acordarme de mis compañeros de Universidad, que sin su apoyo el camino hubiese sido mucho más complicado



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Resumen:

Este trabajo evaluó la viabilidad de la producción de ectoína, un producto de alto valor añadido, a partir del gas de efecto invernadero más abundante, el CO₂.

Se llevaron a cabo experimentos en lotes con el propósito de evaluar la capacidad de producción de ectoína por parte de *Hydrogenovibrio marinus*, utilizando CO₂ como única fuente de carbono. Se logró una producción de 19.1 mg_{ect}g_{biomasa}⁻¹, consumiendo el 18.9% del CO₂ disponible. Los siguientes experimentos se realizaron en un reactor continuo de mezcla perfecta, al optimizar las variables de operación se mejoró tanto la producción de ectoína, la cual aumentó un 41.9%, como su productividad que aumentó un 89.3%.

Los resultados obtenidos permiten demostrar la viabilidad de producir ectoína a partir de CO₂ y concluir cuáles son las mejores condiciones de cultivo y estrategias de operación (tasa de dilución de 0.5 d⁻¹) para maximizar la cantidad producida y la eficiencia del proceso.

Palabras Claves: Bioconversión de gases de efecto invernadero, dióxido de carbono (CO₂), ectoína y *Hydrogenovibrio Marinus*

Abstract:

This research evaluated the feasibility of producing ectoine, a high value-added product, from the most abundant greenhouse gas, CO₂.

Batch experiments were performed with the purpose of evaluating the capacity of *Hydrogenovibrio marinus* to produce ectoine using only CO₂ as carbon source. A production of 19.1 mg_{ect}g_{biomass}⁻¹ was achieved while consuming 18.9% of the available CO₂. The following experiments were carried out in a continuous stirred tank reactor. Operating parameters were optimized to improve ectoine production, which was increased by 41.9%, and ectoine productivity which increased by 89.3%.

The results obtained not only demonstrate the feasibility of producing ectoine from CO₂, but also show which are the best operating conditions for biomass growth and the best operation strategy (dilution rate 0.5 d⁻¹) to maximize the amount of ectoine produced and the efficiency of the process.

Key Words: Carbon dioxide (CO₂), ectoine, greenhouse gas bioconversion and *Hydrogenovibrio marinus*



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Índice

1	Introducción.....	13
1.1	Problemática ambiental.....	13
1.2	Tecnologías de eliminación del CO ₂	15
1.2.1	Tecnologías de tratamiento físico-químicas.....	15
1.2.2	Transformaciones biológicas.....	19
1.3	Microbiología del proceso de fijación de CO ₂	21
1.4	Valorización del CO ₂ a productos de alto valor añadido.....	22
1.4.1	Extremolitos.....	23
1.4.1.1	<i>Ectoína</i>	24
1.4.1.2	<i>Hidroxiectoína</i>	26
1.5	Microorganismos extremófilos de interés.....	27
2	Objetivos.....	29
3	Materiales y métodos.....	31
3.1	Microorganismo y medio de cultivo.....	31
3.2	Métodos.....	31
3.2.1	Preparación del inóculo.....	31
3.2.2	Operación de reactores en continuo.....	33
3.2.3	Métodos analíticos.....	37
3.3	Tratamiento de datos.....	42
4	Resultados y discusión.....	43
4.1	Estudio de la transformación de gases en ectoína en experimentos en lotes.....	43
4.1.1	Producción de ectoína con CO ₂ e H ₂	43
4.1.2	Biotransformación de gases.....	44
4.2	Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para la producción de ectoína con H ₂ y CO ₂	45
4.2.1	Productividad de biomasa y ectoína en la primera operación del reactor.....	45
4.2.2	Capacidad de bioconversión del CO ₂ e H ₂ por <i>H. marinus</i> en la primera operación del reactor.....	48
4.2.3	Productividad de biomasa y ectoína en la segunda operación del reactor.....	50



4.2.4	Capacidad de bioconversión del CO ₂ e H ₂ por <i>H. marinus</i> en la segunda operación del reactor.....	54
5	Conclusiones	57
6	Bibliografía	59
7	Anexo 1. Composiciones	67
7.1	Composición trazas	67
7.2	Composición vitaminas	67
8	Anexo 2: Rectas de calibrado.....	68



Índice de Figuras

Figura 1: Evolución historia española de las emisiones de GEI [2]	13
Figura 2: Emisiones de GEI por sectores en España [6]	14
Figura 3: Técnicas de captura del CO ₂ [15]	16
Figura 4: Reacción de las etanolaminas con el CO ₂ [18]	17
Figura 5: Separación por membranas [20].....	17
Figura 6: Proceso de adsorción [23].....	18
Figura 7: Esquema de un biorreactor de lecho fijo [29]	20
Figura 8: Biorreactor de tanque agitado [30]	20
Figura 9: Proceso de la fotosíntesis en microalgas [27].....	21
Figura 10: Reacción de la quimiosíntesis, donde se reduce el óxido de nitrógeno [33] ..	22
Figura 11: Diferentes tipos de extremolitos [39].....	24
Figura 12: Estructura de la ectoína [43].....	25
Figura 13: Estructura de la hidroxietoína [48].....	26
Figura 14: Imagen microscópica de Hydrogenovibrio marinus [53].....	27
Figura 15: Diagrama PFD del proceso	33
Figura 16: Sistema experimental empleado	35
Figura 17: Cromatógrafo Agilent 8860.....	38
Figura 18: Instrumento para analizar TOC e IC	39
Figura 19: Espectrofotómetro UVmini-1240.....	40
Figura 20: HPLC para el análisis de ectoína.....	41
Figura 21: Incremento medio de la biomasa y la ectoína y su desviación para los triplicados biológicos en lotes. ● naranja: representa la ectoína; Δ azul: representa la biomasa en TSS.	43
Figura 22: La variación de la eficacia de eliminación (RE) del CO ₂ (línea azul continua) y del H ₂ (línea naranja continua) y la concentración de CO ₂ y H ₂ (líneas discontinuas azul y naranja, respectivamente) en el espacio de cabezas frente al tiempo.	44
Figura 23: Variación de oxígeno con el tiempo. La línea continua pertenece a la variación de la eficacia de eliminación media del O ₂ y la línea discontinua a la concentración de O ₂ en el espacio de cabezas frente al tiempo.....	45
Figura 24: Evolución de la biomasa (SST, línea continua) y de la producción de ectoína (línea discontinua) de la operación 1. La línea vertical en el día 7 corresponde con la tasa de dilución 0.05 d ⁻¹ , las líneas verticales en los días 14, 16 y 18 corresponden con una tasa de dilución 0.1 d ⁻¹ y las líneas verticales de los días 20, 22 y 24 corresponden con tasas de dilución de 0.2 d ⁻¹	47
Figura 25: Evolución de la capacidad de eliminación (CEM) del CO ₂ (línea naranja continua) y del H ₂ (línea naranja discontinua) frente al tiempo, y evolución del pH (línea azul) en la operación.....	49



Figura 26: Evolución de la eficacia de eliminación (RE) del CO₂ y H₂ de la primera operación. La línea continua corresponde a la RE del CO₂, mientras que la línea discontinua corresponde a la RE del H₂ 50

Figura 27: Evolución de la biomasa (SST, línea continua) y ectoína (línea discontinua) en la operación 2. Las líneas verticales corresponden con la tasa de dilución de 0.5 d⁻¹..... 52

Figura 28: Evolución de la concentración de proteínas en la segunda operación..... 54

Figura 29: Evolución de la capacidad de eliminación (CEM) del CO₂ (línea azul continua) y del H₂ (línea azul discontinua) y del pH (línea naranja) frente al tiempo de la segunda operación. 55

Figura 30: Evolución de la eficacia de eliminación (RE) del CO₂ (línea continua) y del H₂ (línea discontinua) de la segunda operación. 56

Figura 31: Curva de calibrado del CO₂ 69

Figura 32: Curva de calibrado del H₂..... 69

Figura 33: Curva de calibrado del O₂..... 70

Figura 34: Curva de calibrado de las proteínas..... 70

Figura 35: Curva calibrado de la ectoína..... 71



Índice de Tablas

Tabla 1: Composición del medio mineral.....	31
Tabla 2: Comparativa de las operaciones	36
Tabla 3: Composición de las trazas ácidas	67
Tabla 4: Composición de las trazas básicas.....	67
Tabla 5: Composición de las vitaminas	67



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



1 Introducción

1.1 Problemática ambiental

Entre los principales gases de efecto invernadero (GEI) se encuentran el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el óxido de nitrógeno (N_2O) y los gases fluorados como los hidrofluorocarbonos, los perfluorocarbonos, los clorofluorocarbonos, el hexafluoruro de azufre (SF_6) y el tricloruro de nitrógeno (NF_3) [1], [2].

Entre ellos, el CO_2 es el gas de efecto invernadero más abundante. A pesar de que el CO_2 está presente de manera natural en la atmósfera como parte del ciclo del carbono (circulación natural del carbono entre la atmósfera, los océanos, los suelos, las plantas y los animales), las actividades humanas alteran este ciclo, añadiendo más dióxido de carbono a la atmósfera e influyendo de manera negativa sobre los sumideros naturales, como los bosques o los suelos, que son capaces de eliminar y retener el CO_2 . Gran parte de las emisiones antropogénicas de CO_2 se deben a los combustibles fósiles como el carbón, el gas natural y el petróleo, ya que, durante su proceso de combustión, por ejemplo para la producción de energía, los carbonos que contienen son transformados en CO_2 y emitidos a la atmósfera [3].

Del total de GEI emitidos en 2022 en España, el CO_2 representó el 81%. Además, como se aprecia en la Figura 1, las emisiones ese año aumentaron un 2% con respecto al 2021. Esto se debe a un aumento de la producción de energía en centrales térmicas de carbón, para compensar la disminución de la producción hidroeléctrica por la sequía y el aumento del precio del gas natural debido a la guerra de Ucrania. Mientras, en Europa (Comunidad Europea) las emisiones han disminuido con respecto al 2021, puesto que numerosos países han optado por energías renovables, en lugar de usar el carbón. Sin embargo, globalmente, las emisiones globales de GEI siguen en aumento, siendo los países del este asiático los principales emisores, responsables del 51.0% de las emisiones en el 2022 [2], [4].

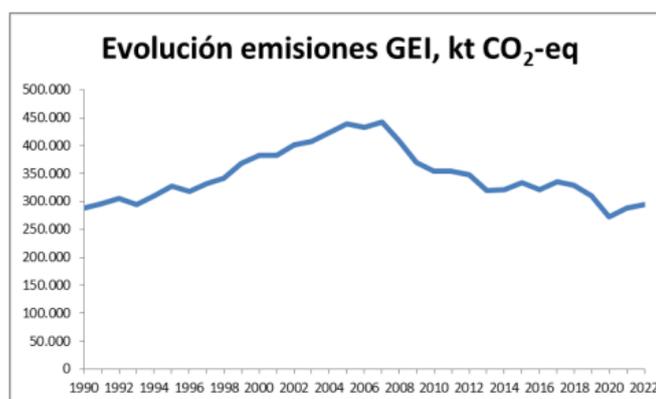


Figura 1: Evolución historia española de las emisiones de GEI [2]



Las principales fuentes de emisiones de CO₂ antropogénicas en el 2021 en España se muestran en la Figura 2. El transporte por carretera fue responsable de un 30.9% de estas emisiones, el transporte aéreo de un 3.0% y el marítimo de un 8.6%. De forma similar, en Europa el transporte terrestre, el aéreo y el marítimo contribuyeron en un 22.7%, 3.8% y 2.0% del total respectivamente. Las emisiones de la industria en España representaron el 25.6%, mientras que en Europa el 22.0%. Por otro lado, destacan las emisiones del sector de la construcción y la industria metalúrgica. La generación de electricidad produce un 16.7% de total de las emisiones en España, y en Europa las emisiones para este sector aumentan hasta un 26.2%. Las emisiones provocadas por la agricultura y la ganadería fueron un 12.5 % y un 11.0% en España y Europa respectivamente, siendo la ganadería responsable del 75.0% de las emisiones. Finalmente, el sector residencial y comercial y la gestión de residuos son los que menos contribuyen a las emisiones de GEI. Por otra parte, los bosques y los suelos han sido capaces de eliminar un 16.1% de las emisiones en España, mientras que en Europa la eliminación natural es de un 6.7% [5], [6], [7].

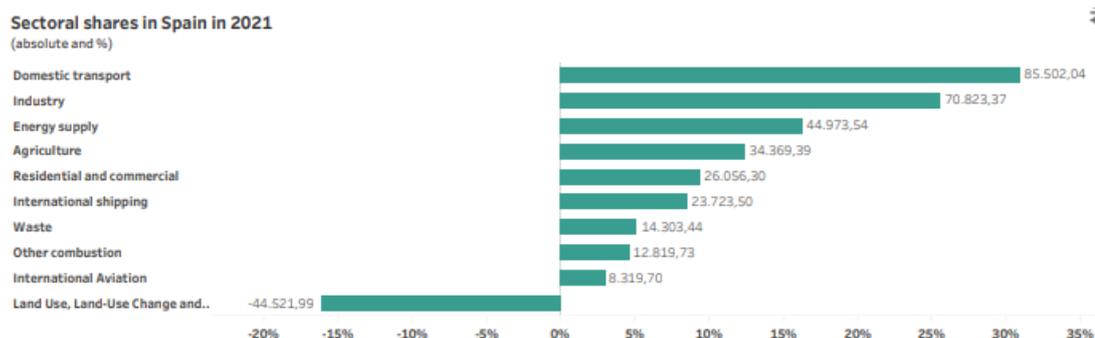


Figura 2: Emisiones de GEI por sectores en España [6]

Los impactos negativos del aumento de CO₂ atmosférico sobre el medio ambiente son evidentes, siendo responsable por ejemplo de la acidificación de los mares o del incremento de la temperatura de la Tierra. Además, también produce daños sobre la salud humana y repercute de forma negativa en la economía. Actualmente se están desarrollando estrategias políticas y sociales para combatir las emisiones de GEI. En 2012, en el acuerdo de París, los miembros de las Naciones Unidas aprobaron una medida para limitar las emisiones de GEI con el fin de mantener la temperatura 2°C por encima de la época preindustrial. En la Unión Europea se siguió con la tendencia del acuerdo de 2012, pero, para impulsar en mayor medida la protección medioambiental, en 2019 acordaron el Pacto Verde Europeo, que pretende llegar a la neutralidad climática en 2050 como límite y reducir las emisiones un 55% con respecto al 1990 antes del 2030. A nivel nacional, se ha desarrollado el Plan Nacional de Adaptación al Cambio Climático (PNACC) 2021-2030, el cual promueve la acción coordinada frente al cambio climático y el desarrollo de una economía más resiliente. Además, en el caso de nuestra región, Castilla y León, también se ha puesto en marcha la Estrategia Regional contra el Cambio Climático en



Castilla y León 2009-2012-2020, con el fin de impulsar y coordinar actividades contra el cambio climático, basadas sobre todo en la economía circular, cuyo objetivo es reducir las emisiones de GEI un 25% para 2030, además de incrementar la circularidad de los materiales, como su reciclaje, generando así una menor cantidad de residuos. En la actualidad se está revisando esta estrategia para publicar los pasos a seguir 2021-2030 [8], [9], [10].

Aunque prevenir las emisiones de CO₂ debe ser siempre la alternativa preferente, en muchas ocasiones no es posible evitar la emisión y se requiere implementar técnicas de tratamiento para eliminar el CO₂ antes de ser emitido a la atmósfera. Algunas de las técnicas más comúnmente implementadas se detallan en Tecnologías de eliminación del CO₂.

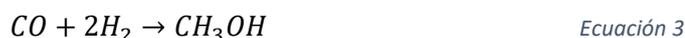
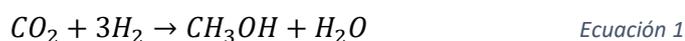
1.2 Tecnologías de eliminación del CO₂

Para evitar los problemas que genera el incremento de las emisiones antropogénicas de CO₂, se han desarrollado diferentes tecnologías, tanto físico-químicas como biológicas, para su eliminación y/o captura y almacenamiento[11].

1.2.1 Tecnologías de tratamiento físico-químicas

1.2.1.1 Transformaciones físico-químicas

La industria está utilizando el CO₂ como materia prima para la síntesis de compuestos de interés. Un ejemplo de ello es la hidrogenación catalítica del CO₂, donde el CO₂ reacciona con gas de síntesis, H₂ y CO para producir metanol, combustible y materia prima para otras reacciones industriales. Las condiciones de operación que requiere la reacción son 250-300°C y 50-100 atm, además se necesitan zinc y cobre como catalizadores [12].



Existen otros métodos para la formación de metanol a partir de CO₂ como la reducción electroquímica. En este proceso el CO₂ se reduce a otros compuestos como el ácido fórmico o el formaldehído. Esta técnica presenta algunas desventajas como el alto potencial necesario para reducir al CO₂, la baja solubilidad de este gas en el agua, la necesidad de catalizadores y el hecho de que el potencial para el desprendimiento del H₂ y de reducción del CO₂ son muy parecidos, por lo que compiten por su realización [12].

1.2.1.2 Tecnologías de captura del CO₂

Las técnicas físico-químicas de captura se basan en operaciones de separación mediante el uso de disolventes químicos o procesos físicos. El CO₂ se puede capturar en diferentes momentos del proceso industrial: (i) antes de su uso, es decir, en el momento previo a la combustión, para conseguir un gas combustible rico en hidrógeno; (ii) después de la combustión (captura post-combustión), donde se retira el CO₂ justo antes de ser expulsado a la atmósfera y que permite eliminar CO₂ a bajas concentraciones; y (iii) captura por oxicomustión, donde al quemarse el combustible con oxígeno muy puro, los gases resultantes de la combustión son CO₂ y vapor de agua, así el CO₂ es fácil de eliminar por condensación. En la siguiente Figura 3 se presentan las principales tecnologías para la captura de CO₂ [13], [14].

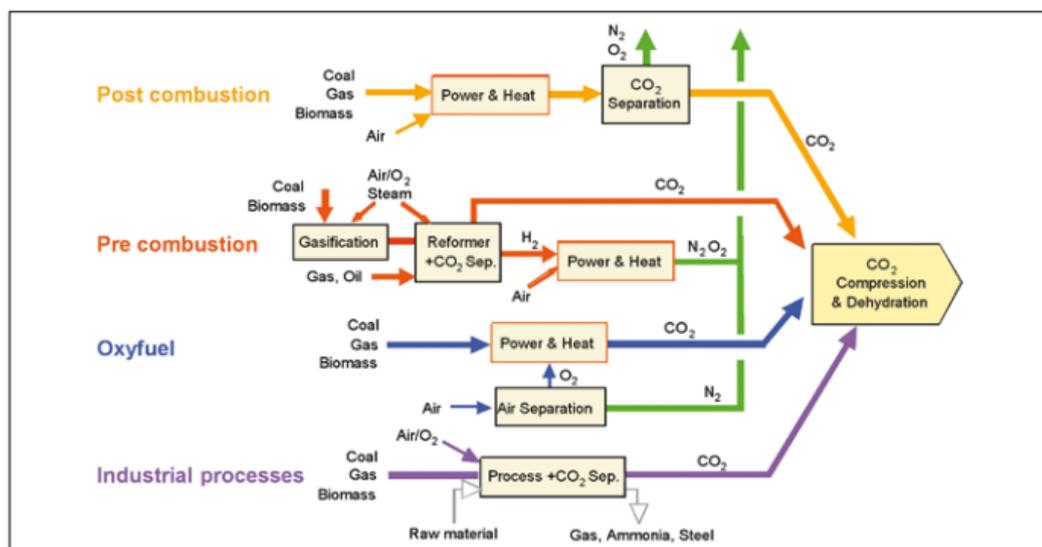


Figura 3: Técnicas de captura del CO₂ [15]

- **Absorción química**

En la absorción química se utilizan disolventes químicos que generan enlaces reversibles entre el soluto y el solvente. Las aminas orgánicas como la monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), trietilamina (TEA) y metildietanolaminas (MDEA) son las más utilizadas, además de por su gran selectividad hacia el CO₂, por su gran capacidad de absorber CO₂ por unidad de volumen. Antes de poder reutilizarse se deben regenerar mediante calentamiento [16], [17].

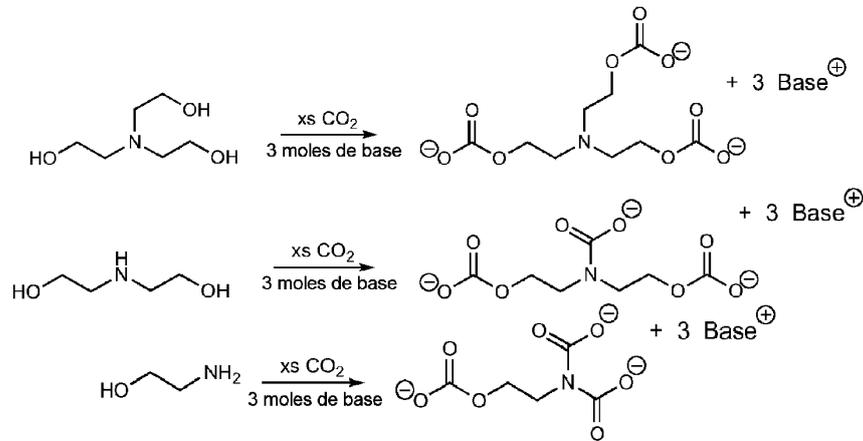


Figura 4: Reacción de las etanolaminas con el CO_2 [18]

- Absorción física

En la absorción física se usan fluidos no reactivos como el agua o el disolvente de Clariant, el cual es una mezcla de ésteres de dimetilo y etilenglicoles. Este proceso se suele utilizar para purificar el gas de síntesis, por tanto, se ponen en contracorriente el gas y el absorbente, que disuelve el CO_2 . El absorbente es regenerado por calentamiento o despresurización [16], [17].

- Membranas

Las membranas se basan en la permeabilidad de los materiales que la conforman, que dejan pasar de manera selectiva un cierto compuesto. El flujo a través de ellas viene determinado por la presión de operación. La separación por membranas posee dos variantes: separación a alta presión donde se trabaja en torno a 420 bares, y separación a bajas presiones, donde se trabaja a presión atmosférica y en la cual la membrana separa el gas bruto de una fase líquida absorbente [16], [19].

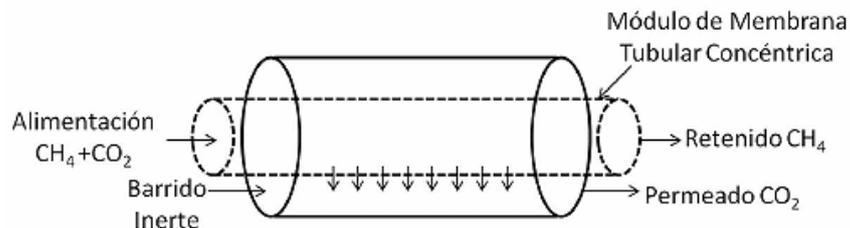


Figura 5: Separación por membranas [20]

- Criogenización

La separación por criogenización se fundamenta en que los diferentes gases que forman el gas bruto poseen diferentes temperaturas de ebullición. De esta manera se pueden separar los compuestos en fase líquida. El proceso consiste en una primera compresión de la mezcla de gases, tras ello se enfría con intercambiadores de calor a lo que sigue una etapa de expansión. Suponiendo que la mezcla es CH_4 y CO_2 , el enfriamiento provoca la condensación del CO_2 , facilitando su eliminación, ya que su punto de ebullición es -78°C , y deja el CH_4 en forma gaseosa, ya que posee un punto de ebullición menor, de -160°C [21].

- Adsorción

La adsorción es un proceso en el cual las moléculas quedan atrapadas en la superficie de un material sólido. El método más común es la adsorción por cambio de presión (pressure swing adsorption, PSA), donde la adsorción tiene lugar a presiones elevadas y el material se regenera disminuyendo la presión. Los principales adsorbentes son zeolitas, carbón activo y silica-gel, los cuales proporcionan una gran separación del CO_2 , pero necesitan un tratamiento previo, ya que deben llegar con una pureza bastante alta para evitar envenenamiento del adsorbente [21], [22].

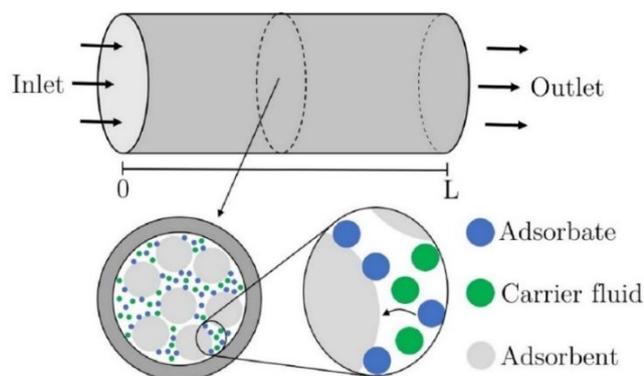


Figura 6: Proceso de adsorción [23]

1.2.1.3 Almacenamiento del CO_2

El almacenamiento es un paso crítico ya que el CO_2 , obtenido por los diferentes métodos de captura, debe ser almacenado de forma permanente y segura. Las principales formaciones geológicas naturales de almacenamiento son los yacimientos de petróleo y gas natural, la formación de salinas profundas y las capas de carbón inexplorables [11], [24].



No obstante, existen otras formas innovadoras de almacenar el CO₂. La primera de ellas consiste en inyectar y disolver el CO₂ en el fondo oceánico, a más de 1000 metros de profundidad, donde quedaría formando una burbuja debido a que, en esas condiciones, presenta una mayor densidad que el agua. Sin embargo, esta opción se está rechazando puesto que puede alterar el ecosistema. Otra opción contemplada se basa en formar carbonatos, que son compuestos muy estables, a partir de la reacción del CO₂ con óxidos metálicos. El inconveniente de esta alternativa es que la cinética de la reacción es muy lenta [24].

1.2.2 Transformaciones biológicas

Los métodos físico-químicos descritos anteriormente no son económicamente viables para el tratamiento del CO₂ en bajas concentraciones, ya que requieren altas presiones y temperaturas y/o el uso de catalizadores o compuestos químicos. Además, algunos de ellos generan subproductos que requieren un tratamiento posterior. Debido a ello, una alternativa de gran potencial para controlar las emisiones de CO₂ a la atmósfera, de menor coste y más respetuosa con el medio ambiente, es el tratamiento biológico en biorreactores específicamente diseñados para este fin [25].

Los métodos biológicos de tratamiento consisten en la actuación de microorganismos como catalizadores de las reacciones que promueven la degradación de las sustancias que se desean eliminar, por lo general sustancias nocivas para el medioambiente y para la salud humana. Se incluyen aquí no sólo los GEI, sino también olores, compuestos orgánicos volátiles, etc. Por lo tanto, los microorganismos como bacterias, algas u hongos, serán seleccionados específicamente para el contaminante objetivo. Cabe remarcar que estos tratamientos son más flexibles a cambios en las condiciones ambientales y menos costosos, puesto que necesitan menos cantidad de energía para su funcionamiento. Esto convierte a los métodos biológicos en una alternativa más sostenible para el medio ambiente que las técnicas físico-químicas [26], [27].

Los biorreactores que se utilizan en las tecnologías de tratamiento de gases contaminantes se pueden clasificar en dos grupos: biorreactores de lecho empacado como los biofiltros y biofiltros percoladores, y biorreactores de crecimiento en suspensión, como los reactores de tanque agitado y los de burbujeo. En los primeros, los microorganismos crecen formando una biopelícula sobre el soporte (Figura 7), mientras que en los segundos los microorganismos crecen de manera libre en el medio líquido (Figura 8) [28].

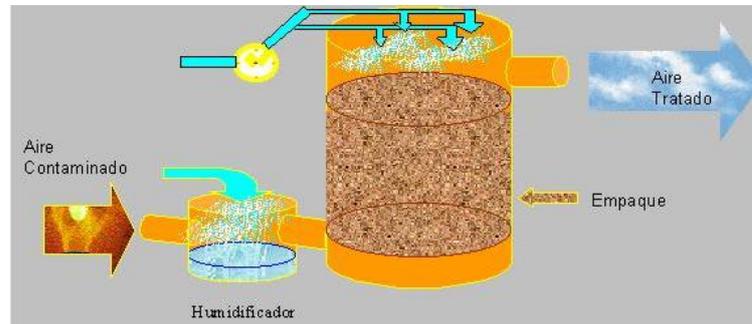


Figura 7: Esquema de un biorreactor de lecho fijo [29]

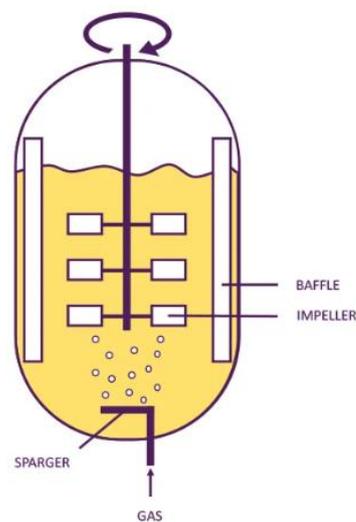


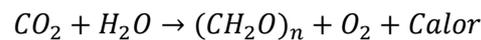
Figura 8: Biorreactor de tanque agitado [30]

Las tecnologías de tratamiento biológico de gases de efecto invernadero llevan investigándose y desarrollándose desde la década de los 80. No obstante, todavía existen muchas limitaciones para su implementación a mayor escala. En este sentido, la viabilidad para la eliminación del CO₂ y otros GEI está limitada por la transferencia de los contaminantes desde la fase gas a los microorganismos como consecuencia de la baja solubilidad de éstos. Asimismo, el conocimiento de la microbiología encargada de la eliminación de GEI es escaso, y son muy pocos los estudios sobre la transformación del CO₂ en sustancias de alto valor social y económico, como los fármacos, los cosméticos y los ingredientes alimentarios [25], [31]. Esto último es de gran importancia para aumentar la rentabilidad de los procesos biológicos de tratamiento del CO₂.

1.3 Microbiología del proceso de fijación de CO₂

La fijación biológica del CO₂ se lleva cabo mediante fotosíntesis en las plantas y otros microorganismos, como las microalgas y las cianobacterias, que son capaces de realizar la fotosíntesis con una eficacia incluso mayor que las plantas (Figura 9). Ambos tipos de microorganismos, microalgas y cianobacterias, habitan en toda la corteza terrestre, siendo capaces de vivir en ambientes extremos como geiseres o suelos desérticos, entre otros [27].

Los microorganismos fotosintéticos utilizan el CO₂ como única fuente de carbono y la luz solar como única fuente de energía para la producción de macromoléculas (Ecuación 4). La asimilación del CO₂ por organismos fotosintéticos puede variar en función de la temperatura, el pH, la intensidad de la luz, el nivel de O₂ y de CO₂. Por otro lado, contaminantes como el SO_x, el NO_x o los metales pesados, pueden impedir el crecimiento de los microorganismos [27].



Ecuación 4

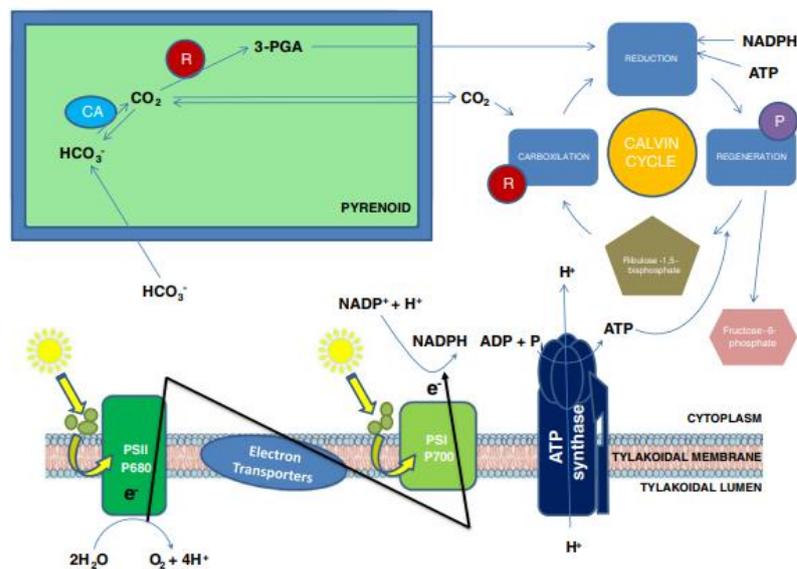


Figura 9: Proceso de la fotosíntesis en microalgas [27]

Otra alternativa para la fijación biológica del CO₂ son los microorganismos quimiolitautótrofos. Estos microorganismos emplean la quimiosíntesis para la fijación del CO₂, que consiste en la producción de compuestos orgánicos a partir de compuestos inorgánicos, como el CO₂, y utilizan la energía generada por la oxidación de compuestos inorgánicos, como el H₂. También consta de dos etapas: una primera para generar el agente reductor y energía en forma de ATP y una segunda en la que se fija el CO₂ y se produce una macromolécula orgánica (Figura 10) [32].

Las bacterias y arqueas quimiosintéticas se clasifican en diferentes grupos en función de la molécula que reduzcan: sulfurreductoras que utilizan H_2S como agente reductor; bacterias del nitrógeno que usan óxidos de nitrógeno; bacterias del hierro; bacterias hidrogenotrofas, que utilizan el H_2 como fuente de energía, etc. [32].

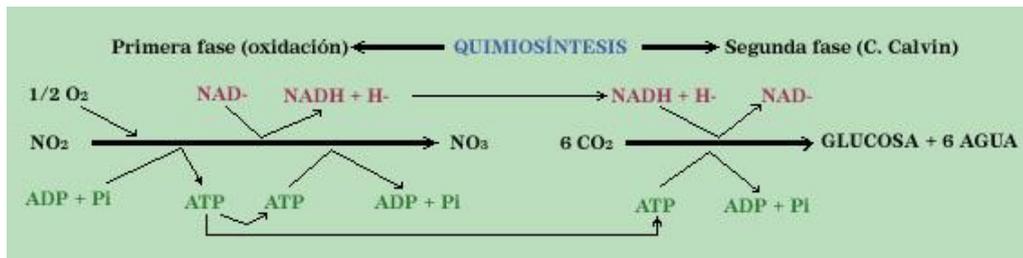


Figura 10: Reacción de la quimiosíntesis, donde se reduce el óxido de nitrógeno [33]

Los procesos de la fotosíntesis y quimiosíntesis tienen bastantes puntos en común, por ejemplo, los dos utilizan el CO_2 como fuente de carbono para la elaboración de biomasa. Sin embargo, la principal diferencia entre ambas radica en la forma de obtener la energía. En el proceso de la fotosíntesis la energía se obtiene de la luz solar, por lo tanto, es estrictamente necesario que se produzca en un lugar expuesto a la luz. Por el contrario, en la quimiosíntesis, la energía se obtiene de las reacciones de oxidación de ciertos compuestos. Por esta razón, los organismos fotosintéticos necesitan vivir en zonas donde llegue la luz, ocupando un gran terreno, mientras que los organismos quimiosintéticos pueden habitar zonas inhóspitas, donde no llega la luz del sol. Además, estos organismos quimiosintéticos toleran mejor las concentraciones de CO_2 altas, que para los fotosintéticos pueden llegar a ser tóxicas [34].

1.4 Valorización del CO_2 a productos de alto valor añadido

Como se ha comentado anteriormente, el cambio climático es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la sociedad actual, por lo que gobiernos y empresas están poniendo en marcha nuevas iniciativas para combatirlo. Una de ellas es la economía circular sostenible, que busca optimizar el uso de los recursos y minimizar los residuos generados, fomentando el reciclaje y la reutilización [35]. Es decir, busca hacer frente al cambio climático atajando problemas medioambientales como la sobreexplotación de recursos o la contaminación. Así, la obtención de productos de valor a partir de los gases de efecto invernadero constituye una vía de gran interés para alcanzar los objetivos de la economía circular sostenible, ya que utiliza como fuente de materia prima contaminantes gaseosos con disponibilidad casi ilimitada y de bajo coste. Actualmente, existen procesos industriales que emplean CO_2 como materia prima, como los de producción de metanol, urea y ácido salicílico. Sin embargo, puesto que el CO_2 es una molécula inerte, la transformación química en otros compuestos por métodos físicos requiere mucha



energía, lo que aumenta los costes y reduce el margen de beneficio. Por ello, se está optando por hacer uso de procesos biotecnológicos [35], [36].

Hoy en día, existen procesos biotecnológicos mediante los cuales los microorganismos consumen CO₂ y producen un reducido número de compuestos, principalmente alcoholes y ácidos orgánicos. Por ejemplo, empresas como Phycal y Algenol están comercializando sus algas, que producen aceites y etanol a partir de la luz solar, el CO₂ y el agua salada. Otra empresa, LanzaTech, produce etanol gracias a la bacteria *Clostridium autoethanogenum* y están investigando la conversión del CO₂ a acetona e isopropanol [34].

No obstante, estos procesos no son numerosos y la rentabilidad es limitada. Como se ha comentado, los microorganismos quimiosintéticos proporcionan mejores condiciones de cultivo que los fotosintéticos, por lo que las nuevas líneas de investigación optan por la utilización de microorganismos quimiosintéticos extremófilos, capaces de producir osmolitos orgánicos, conocidos como extremolitos, para protegerse y así sobrevivir. Un ejemplo de estos extremolitos producidos es la ectoína, un compuesto cuyo valor de mercado se encuentra en torno a los 1000 US\$/Kg [35], [36].

1.4.1 Extremolitos

Los microorganismos extremófilos han sido capaces de desarrollar vías metabólicas para ser capaces de vivir y desarrollarse en hábitats y condiciones extremas como, por ejemplo, pozas termales, lagos salinos, ambientes ácidos, etc. [37]. Se distinguen varios tipos de extremófilos en función de las condiciones de su hábitat: termófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento es de 45°C, pudiendo incluso superar los 80°C (hipertermófilos); psicrófilos, los cuales necesitan una temperatura menor a 10°C para su desarrollo; acidófilos que viven en un ambiente donde el pH es inferior a 5; alcalófilos que son capaces de desarrollarse a pH superior a 9; piezófilos, que necesitan presiones superiores a la atmosférica para sobrevivir; halófilos, capaces de vivir en hábitats con gran salinidad, del 5-30% de sal; y xerófilos, capaces de vivir con actividades del agua inferiores a 0.9, entre otros [38].

La biotecnología se ha reinventado gracias al descubrimiento de estos microorganismos. En este sentido, investigaciones actuales están poniendo el foco en proteínas y enzimas que son capaces de sintetizar los extremófilos y que pueden realizar su función en condiciones extremas de temperatura, presión, pH, etc. Esto resulta muy interesante dado que uno de los problemas principales de los procesos industriales catalizados por enzimas era la desnaturalización de la misma al estar sometida a condiciones extremas [39].

Los extremófilos se encuentran sometidos a estrés debido a las condiciones extremas de sus hábitats, por ello han sido capaces de desarrollar compuestos que protegen a la célula

de las condiciones exteriores. Estos compuestos, que se denominan “extremolitos” o “solutos compatibles”, son compuestos con bajos pesos moleculares y muy polares. Los osmolitos son moléculas que poseen una función protectora y una función estabilizante de macromoléculas o del material genético. A pesar de sus características, no interactúan directamente con las proteínas, por lo tanto, la actividad catalítica no se ve alterada. Además, se encargan de regular la presión osmótica de la célula con el exterior, por ejemplo, los halófilos poseen dos mecanismos para regular la osmosis, el primero se basa en el uso de iones potasio y cloruro para alcanzar el equilibrio osmótico, mientras que en el segundo se acumulan pequeñas moléculas de bajo peso molecular, osmolitos, para contrarrestar la concentración de sal [39], [40].

Existen varios tipos de extremolitos, si bien es importante destacar que no todos los extremófilos son capaces de generar todos ellos. A continuación, se presentan los diferentes tipos de extremolitos existentes:

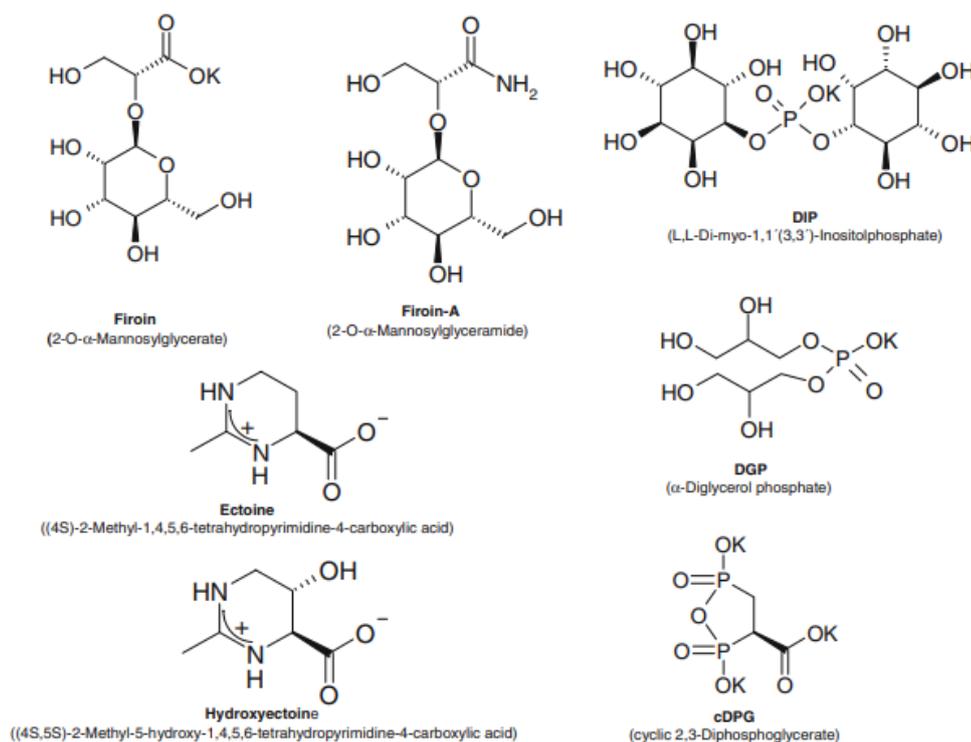


Figura 11: Diferentes tipos de extremolitos [39]

1.4.1.1 Ectoína

La ectoína (ácido 2-metil-3,4,5,6-tetra-4-pirimidinocarboxílico) (Figura 12), uno de los tipos de extremolitos existentes, es un compuesto cíclico derivado del aspartato. Fue descubierta en los años 80 y hoy en día es uno de los compuestos más rentables

producidos por microorganismos, su valor de mercado ronda los 1000 US\$/kg, sin embargo, estudios recientes elevan el precio hasta los 14000-18000 €/kg [41], [42].

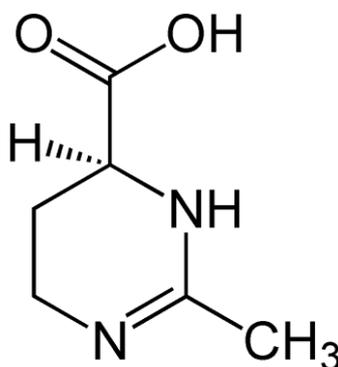


Figura 12: Estructura de la ectoína [43]

Las bacterias halófilas, es decir, las que habitan en medios con altas concentraciones de sal (NaCl), han sido capaces de desarrollar compuestos que les permitan vivir en esas condiciones de estrés osmótico, pero que también les permiten soportar cambios en la presión, temperatura, etc. Uno de estos compuestos es la ectoína. La ectoína protege a las bacterias del estrés salino al que se encuentran sometidas, entre otros tipos de estrés, porque proporciona un equilibrio osmótico. También tiene una función estabilizadora, puesto que es capaz de estabilizar enzimas, y cuenta con un papel destacado en el plegamiento y agregación de péptidos y proteínas. Todo ello sin interactuar con las enzimas, por lo que la actividad metabólica de la bacteria no se ve alterada [44], [45]. Por otro lado, la ectoína es capaz de formar una cáscara de hidratación alrededor de macromoléculas, como las proteínas o el ADN, con el fin de protegerlas. También es capaz de formar esta cáscara alrededor de los lípidos para mantener y estabilizar las bicapas lipídicas [44], [45].

La producción de ectoína mediante la síntesis química ha disminuido durante las últimas décadas, dando paso a la producción de ectoína a partir de bacterias. Esto se debe a que presenta mayor rendimiento, además de ser una opción menos costosa, ya que producen el compuesto con un alto grado de pureza, reduciendo los costes de purificación. Su principal aplicación se encuentra en el sector cosmético, puesto que es capaz de hidratar las células humanas, evitando la sequedad, mientras las dota de protección frente al calor, a la luz UV y a los alérgenos. Además, al tratarse de un compuesto inocuo no provoca ninguna alergia ni irritación, en definitiva, no posee ningún efecto secundario lo cual la convierte en idónea para este tipo de aplicaciones. Otro sector en el que se utiliza ectoína es el sector farmacéutico, para la fabricación de spráis nasales y otros productos de inhalación. También se emplea en el campo de la medicina, donde se ha utilizado para inhibir las nanopartículas que provocan reacciones inflamatorias en las células epiteliales de los pulmones y en el cual ha permitido grandes avances contra enfermedades como el



Alzheimer. Todavía hay muchas aplicaciones de la ectoína que se desconocen, por ello existen múltiples investigaciones en la actualidad [46], [47].

1.4.1.2 Hidroxiectoína

La hidroxiectoína (ácido 2-metil-5-hidroxi-1,4,5,6-tetra-4-primidinicarboxílico) (Figura 13) es un derivado hidroxilado de la ectoína, por lo que también se trata de un tipo de extremolito. Al diferenciarse de la ectoína por el grupo hidroxilo presenta unas propiedades protectoras adicionales y posee un valor de mercado aún mayor que el de la ectoína [48], [49].

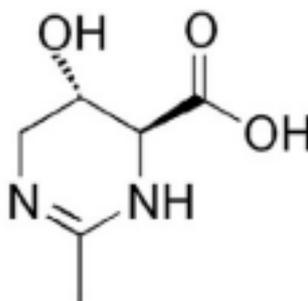


Figura 13: Estructura de la hidroxiectoína [48]

La gran mayoría de microorganismos que sintetizan hidroxiectoína también sintetizan ectoína, aunque en mayores concentraciones, ya que estos dos extremolitos se suelen encontrar juntos. Para favorecer la producción de hidroxiectoína frente a la ectoína hay que aumentar la salinidad y temperatura del medio de cultivo [49], [50].

La hidroxiectoína complementa las funciones protectoras y estabilizadoras de la ectoína, debido a que presenta una temperatura de transición vítrea más elevada, aumenta la protección de la bacteria frente a la sequedad y al estrés por calor. Por otro lado, es capaz de estabilizar la estructura de las macromoléculas en mayor grado que su precursora, la ectoína. Sin embargo, las concentraciones y la extracción de la hidroxiectoína son su principal desventaja, puesto que el grupo hidroxilo añade otro centro quiral, complicando aún más su extracción. Además, si se aumenta la salinidad y la temperatura del medio para favorecer la síntesis de hidroxiectoína se acentúa el problema de la corrosión, requiriendo otra etapa más de purificación y aumentando así los costes [48], [50], [51].

En lo que se refiera a usos comerciales, se emplea para la protección de la piel frente a la luz UV, en medicamentos para frenar el Alzheimer, para el tratamiento de rinovirus y adenovirus, o para las enfermedades alérgicas respiratorias [52].

1.5 Microorganismos extremófilos de interés

La bacteria *Hydrogenovibrio marinus* (Figura 14) ha sido seleccionada para la realización de este proyecto. Esta bacteria se aisló por primera vez en el agua de mar de la costa de Shonan, en Kanagawa, Japón. Se trata de una nueva cepa de *Hydrogenobacter*, la primera bacteria mesófila, aeróbica y oxidante de hidrógeno que es totalmente autótrofa [53].

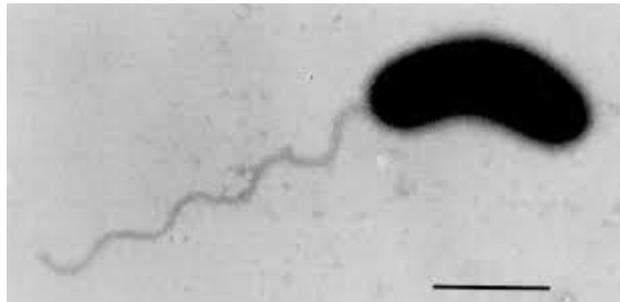


Figura 14: Imagen microscópica de *Hydrogenovibrio marinus* [53]

Hydrogenovibrio marinus es una bacteria del grupo de gram negativas que se suele presentar en solitario. No genera esporas y presenta un flagelo polar, el cual la dota de movilidad. Se trata de una bacteria obligatoriamente quimiolitotrofa, donde el oxígeno es el aceptor de electrones y que utiliza hidrógeno como donador de electrones, aunque también puede usar azufre elemental o compuestos de azufre, como el tiosulfato y tetratiolato. Por último, su única fuente de carbono es el CO_2 y emplea el ciclo de Calvin-Benson para fijar el dióxido de carbono. Por otra parte, su fuente de nitrógeno son los iones amonio y la urea, ya que los nitritos pueden inhibir su crecimiento [53], [54].

Es una bacteria con condiciones moderadas de cultivo, su temperatura óptima es 37°C y su pH óptimo de 6.5. Por otro lado, pertenece al grupo de los halófilos, por lo que necesita concentraciones en torno a 0.5 M de NaCl para un crecimiento óptimo. Debido al estrés salino al que está sometida produce ectoína para protegerse. Además, presenta una gran resistencia al oxígeno. Por todo ello se trata de una opción ideal porque presenta una gran velocidad de crecimiento, consume CO_2 y, además, es capaz de producir un compuesto de alto valor añadido, la ectoína [53], [54].



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



2 Objetivos

Este trabajo fin de grado tiene como objetivo principal estudiar la viabilidad de la bacteria extremófila *Hydrogenovibrio marinus* para la conversión y valorización del CO₂ en un compuesto de alto valor en la industria farmacéutica y médica: la ectoína.

Este objetivo principal se alcanzará mediante los siguientes objetivos específicos:

- Prueba de concepto de la producción de ectoína con *Hydrogenovibrio marinus* usando CO₂ como única fuente de carbono.
- Optimización de las condiciones de operación del reactor, la tasa de renovación del medio y el tiempo de residencia de los gases.
- Evaluación de la productividad de ectoína y la eficiencia de conversión del CO₂.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



3 Materiales y métodos

3.1 Microorganismo y medio de cultivo

Para la conversión del CO₂ en compuestos de valor se utilizó la cepa *Hydrogenovibrio marinus* (DSM 11271), la cual se adquirió de la colección de cultivos Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). El medio de cultivo se preparó siguiendo la composición que se muestra en la Tabla 1. De esta manera se obtuvo un medio de cultivo con una concentración salina del 6% (NaCl).

Tabla 1: Composición del medio mineral

Medio Mineral	g/L
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1
NH ₄ Cl ₂	0.5
NaCl	60
KNO ₃	1
Trazas ácidas	1mL
Trazas básicas	1mL

Las disoluciones de los elementos “trazas” que se añadieron al medio mineral se prepararon siguiendo la composición que se indica en el Anexo 1. Composiciones. Para un correcto crecimiento de las bacterias, se agregó la solución de vitaminas, cuya composición también puede consultarse en el Anexo 1. Composiciones

Los reactivos empleados para preparar el medio mineral y las soluciones traza se obtuvieron de la empresa PanReac AppliChem-ITW Reagents (Barcelona, España) con una pureza superior al 99%.

Se trabajó con una mezcla de CO₂ e H₂ sintética, compuesta por 20% de CO₂ y 80% de H₂ (v/v), almacenados en una botella de 40 L (Linde, España), a una presión inicial de 100 bares.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación del inóculo

En primer lugar, se añadieron 200 mL de medio mineral al 6% de NaCl previamente descrito en Microorganismo y medio de cultivo, en botellas de 1.2 L (Simax, España) selladas con un septum y tapones de rosca. Las botellas con el medio se esterizaron en un autoclave (Raypa, España) a 120°C y 1.2 atm durante 20 minutos para evitar cualquier riesgo de contaminación biológica. Toda la experimentación se realizó bajo condiciones



de esterilidad, es decir, trabajando bajo llama o en una campana de flujo laminar. El espacio de cabezas de las botellas presentó una composición del 10% O₂, 10% CO₂, 40% H₂ y el resto nitrógeno (N₂). Esta mezcla se preparó en bolsas Tedlar con capacidad de 25 L (MediSense, Países Bajos) mediante rotámetros previamente calibrados para cada gas (Aalborg Intrumente Model P, USA). A continuación, se reemplazó el espacio de cabeza de las botellas con un compresor (C5, Electro AD, España), filtrando la mezcla gaseosa a través de filtros estériles de 0.22 μm antes de entrar a las botellas, para mantener la esterilidad.

Posteriormente, se ajustó el pH de las botellas al pH óptimo (pH 7.0) para el crecimiento de la cepa con NaOH 6M, se añadieron 2 mL de vitaminas a cada botella y se inoculó con 20 mL de la cepa de *H. marinus* que previamente presentaba un crecimiento activo. Las botellas inoculadas se dejaron en agitación a 130 rpm en la cámara caliente, a 37°C hasta que alcanzaron un crecimiento exponencial. Todo el procedimiento se realizó por triplicado. Adicionalmente, se prepararon controles negativos abióticos en las mismas condiciones con el fin de detectar eliminación abiótica de los gases de estudio, además de asegurar que no creció otro tipo microorganismo no deseado.

Para poder determinar el consumo de gas, se midieron periódicamente las concentraciones de CO₂ e H₂ en el espacio de cabeza de las botellas mediante cromatografía de gases, volviendo a reemplazar el espacio de cabezas cuando el CO₂ y el H₂ se degradaron casi por completo. Para determinar el crecimiento de *H. marinus* se hizo un seguimiento de la densidad óptica (OD), el pH y producción de ectoína (ver Métodos analíticos).



- Rotámetro (x 2) (Aalborg Intrumente Model P, USA) permitió controlar el caudal de entrada a los reactores, ajustado a 8 mL min^{-1}
- Reactores (x 2) (V-102, V-103) (Afora, Barcelona, España) con unas dimensiones de 10 cm de diámetro y altura de 15 cm, con un volumen total de 1.2 L.
- Baño térmico (E-101) (JP Selecta Digiterm S-150, Barcelona, España) calentó e impulsó agua caliente a través del encamisado del reactor, para que este mantuviera su temperatura interior constante.
- Placa agitadora (Fisher Scientific Fb 15045, Madrid, España) permitió mantener una agitación constante en el reactor.
- Difusor, con un tamaño de poro de $15 \mu\text{m}$, a través del cual se inyectó la mezcla de gases mejorando así la transferencia de materia.

Las bolsas Tedlar de 25 L se rellenaron periódicamente con el CO_2 e H_2 contenido en las botellas sintéticas. El contenido de las bolsas se alimentó de forma continua a la cámara de mezcla mediante la bomba peristáltica a un caudal de 8 mL min^{-1} . En la cámara se mezclaba con una corriente de 8 mL min^{-1} de aire, controlada a través del controlador de flujo másico. De esta forma, se obtuvo una mezcla compuesta de 10% O_2 , 10% CO_2 , 40% H_2 y el resto N_2 . La mezcla de gases se dividió en dos corrientes iguales, cuyo caudal estaba regulado a 8 mL min^{-1} por sendos rotámetros, para alimentar a los biorreactores. Este flujo de entrada y volumen de reactor dieron un tiempo de residencia del gas de 2 horas. Antes de entrar al reactor la corriente de entrada pasaba a través de un filtro de $0.22 \mu\text{m}$, como medida de esterilidad.

Los gases se introdujeron de manera continua a través de un difusor de acero inoxidable con poros de $15 \mu\text{m}$ de tamaño, situado en el fondo del reactor, produciendo finas burbujas que aumentaron la superficie de contacto entre la fase gas y la líquida, mejorando la transferencia de los gases al medio. La homogenización de la biomasa se consiguió gracias a una agitación magnética continua a 130 rpm. Para mantener una temperatura de 31°C constante en el interior del reactor, se utilizó un baño térmico que calentó el agua que fluía por el encamisado del reactor.

El sistema contaba con varios puntos de toma de muestra: dos tomas de muestra de la fase gas, una en la corriente de entrada y otra en la corriente de salida del reactor; y una toma de muestra para la fase líquida. Por último, los gases de la corriente de salida del reactor se llevaron al sistema de extracción del edificio.

3.2.2.2 Procedimiento experimental



Figura 16: Sistema experimental empleado

Los experimentos que se llevaron a cabo se dividen en dos etapas: la primera, basada en el crecimiento de las bacterias en botellas de ensayo y, la segunda, basada en la operación en continuo del biorreactor.

- Crecimiento en botellas.

Al inicio, se prepararon las botellas con el inóculo, se siguió y se controló el crecimiento en las botellas, como se ha explicado en el apartado anterior (Preparación del inóculo). Cuando el crecimiento alcanzó la fase exponencial se inoculó el reactor, dando paso a la siguiente fase, la operación en continuo del reactor.

- Operación en continuo y optimización del reactor.

La segunda parte consistió en la operación en continuo del biorreactor. En primer lugar, se realizó un ensayo abiótico del funcionamiento del sistema en continuo, comprobando la composición de los gases CO_2 , H_2 y O_2 en la entrada y la salida del reactor. De esta forma, se comprobó el correcto funcionamiento del sistema, descartando fugas. Para evitar la contaminación, se esterilizó el reactor con 1L de medio mineral en un autoclave (Raypa, España) a 120°C durante 20 minutos. Una vez estéril, se ajustó el pH del medio al valor



óptimo para el crecimiento de la bacteria (pH 7) añadiendo 2 mL de solución NaOH 6M y se conectó al sistema, permitiendo el flujo de los gases.

Se llevaron a cabo dos estrategias de operación diferentes. En la Tabla 2 se muestran los parámetros más importantes en ambas operaciones. En ambos casos se usaron diferentes tasas de dilución con el fin de promover el crecimiento celular, fomentar altas productividades de ectoína y evitar la acumulación de metabolitos inhibitorios.

Tabla 2: Comparativa de las operaciones

Parámetros	Operación 1	Operación 2
Duración (días)	26	26
Concentración de NaCl (%)	6	6
Tiempo de residencia del gas (horas)	2	2
Tasa de dilución del líquido (días ⁻¹)	0.05 0.1 0.2	0.5
Caudal de entrada del gas (mL min ⁻¹)	8	8
CO ₂ (%)	10	10
Temperatura (°C)	37	31

En ambos casos, una vez se comprobó que el pH estaba en el rango apropiado, se procedió a inocular el reactor con la cepa *H. marinus*. Previamente, se extrajeron 35 mL del medio para analizar los parámetros iniciales: concentraciones de entrada y salida de los gases CO₂, H₂ y O₂, OD (600 nm) (2 mL), pH (3 mL), sólidos suspendidos totales (SST) (10 mL) y concentraciones de carbono orgánico total (TOC) (10 mL) y carbono inorgánico (IC) (10 mL). A continuación, se inoculó el reactor, reemplazando 500 mL del medio que contenía el reactor por 500 mL de los inóculos que se encontraban en un crecimiento exponencial, añadiéndose 5 mL de vitaminas. Una vez inoculado, se extrajeron 8 mL del medio para determinar pH, OD y la concentración inicial de proteínas y ectoína.

Antes de cada reemplazo, se tomaron muestras del medio del reactor para analizar el TOC, el IC y los SST. La tasa de dilución se calculó de acuerdo con la Ecuación 5. Se estudiaron varias tasas de dilución diferentes:



$$Td = \frac{V_T \text{ remplazado}}{V_T t} = [d^{-1}] \quad \text{Ecuación 5}$$

Operación 1:

Tras inocular el reactor hubo una etapa de estabilización y crecimiento de 7 días. En el día 7 se aplicó una tasa de dilución de $0.05 d^{-1}$, que se aumentó a $0.1 d^{-1}$ en los días 14, 16 y 18. A partir del día 20, se aumentó la tasa de dilución hasta $0.2 d^{-1}$, días 20, 22 y 24. Tras 26 días de operación se puso fin a la operación 1.

Operación 2:

Tras el fin de la operación 1, se volvió a realizar la prueba abiótica y a inocular como se ha explicado anteriormente, iniciando la operación 2. Durante los primeros 7 días hubo una etapa de estabilización. En el día 7 se aplicó una tasa de dilución de $0.5 d^{-1}$, la cual se mantuvo constante durante todo el experimento, días 11, 12, 13, 17 y 23. Cuando trascurrieron 26 días con el reactor en funcionamiento, y los parámetros de crecimiento se mantuvieron estables, se puso fin a la operación 2.

Para ambas operaciones, se realizó un seguimiento diario del reactor, basado en el análisis del pH, OD y el consumo de los gases. Además, se extrajeron diariamente muestras de ectoína para ver su evolución a lo largo de la operación. En la operación 2 se añadió el análisis de la cantidad de proteínas producidas por *H. marinus* durante el seguimiento diario del reactor.

3.2.3 Métodos analíticos

La composición de las corrientes gaseosas se determinó mediante cromatografía de gases. Para ello se muestrearon las botellas y la entrada y la salida del reactor con jeringas de gas herméticas de 250 μL (Hamilton, USA). Las muestras gaseosas se inyectaron en duplicado en un GC-TCD (Agilent 8860, USA), equipado con un detector de conductividad térmica. Las temperaturas del inyector, horno y detector fueron 150°C , 55°C y 200°C respectivamente, mientras que la presión del inyector fue de 16.6 psi. La fase móvil estaba constituida por Helio, debido a que se trata de un gas inerte, por lo que no reaccionó con la muestra, además, permitió una mejor resolución, ya que es capaz de transportar los elementos más rápido a través de la columna debido a su baja densidad y alta difusividad [55], con un caudal de 4 mL min^{-1} .



Figura 17: Cromatógrafo Agilent 8860

El consumo de cada compuesto en las botellas se calculó como la diferencia entre la concentración del mismo a lo largo del tiempo entre el tiempo empleado en consumirlo (Ecuación 6). En el caso de los reactores operados en continuo, la concentración de los gases se midió a la entrada y a la salida del reactor mediante una jeringa de gas hermética (Hamilton, USA) de 250 μL . En el Anexo 2: Rectas de calibrado se detalla cómo se realizaron las rectas de calibrado. Con las áreas obtenidas de cada compuesto y las rectas de calibrado, que relacionan el área con la concentración, se determinó la concentración de cada uno de los compuestos presentes en la muestra. También se utilizaron la capacidad de eliminación media (CEM) (Ecuación 7) y la eficacia de eliminación (RE) (Ecuación 8) para la eficacia del proceso en cuanto a eliminación de compuestos gaseosos. La capacidad de eliminación informa de la degradación del compuesto por unidad de tiempo y volumen, mientras que la eficacia de eliminación indica el porcentaje que ha disminuido un compuesto.

$$\text{Consumo}_x = \frac{C_{t_x} - C_{t+1x}}{(t+1) - t} = \left[\frac{\%}{d} \right] \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{CEM}_x = \frac{Q \cdot (C_{e_x} - C_{s_x})}{V_R} = \left[\frac{g}{m^3 h} \right] \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{RE}_x = \frac{(C_{e_x} - C_{s_x})}{C_{e_x}} * 100 = [\%] \quad \text{Ecuación 8}$$

Para determinar el carbono inorgánico (IC) y el carbono orgánico total (TOC) disuelto en el medio mineral se utilizó un analizador de carbono orgánico total TOC-L CPH-TNM-1 (Shimadzu, Japón). Los 10 mL de cada muestra se filtraron con un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm y se diluyeron con agua mili-Q en proporción 1:3. En el análisis del TOC se busca obtener la concentración del carbono orgánico, por lo tanto, se bajó el pH hasta un valor aproximadamente de 2 añadiendo 1 mL de HCl 0.5 M para liberar todo el carbono inorgánico (CO_2) disuelto, mientras que en el IC se busca obtener la concentración de carbono inorgánico, aumentando el pH hasta un valor cercano a 9 añadiendo 180 μL de

NaOH 0.5 M, atrapando todo el CO₂. Cada vez que se analizaron las muestras, se midieron el blanco, agua mili-Q, el patrón de carbono total (TC) 100 mg L⁻¹, el patrón de IC 100 mg L⁻¹, antes y después de analizar las muestras, para garantizar la veracidad de los resultados.



Figura 18: Instrumento para analizar TOC e IC

Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron mediante el método estándar [56]. El procedimiento comenzó midiendo el peso del filtro de 0.22 μm en seco. A continuación, se realizó la filtración a vacío de 10 mL de la muestra. Se lavó tres veces con el mismo volumen de agua mili-Q que el de la muestra original, con el fin de arrastrar cualquier sólido y disolver los cristales de sal que pudieran haber quedado. El filtro se secó en una estufa a 80°C durante 24 horas, para eliminar toda la humedad. Tras 24 horas, se volvió a pesar el filtro previamente atemperado a temperatura ambiente. La concentración se determinó a partir de la siguiente Ecuación 9, donde m_f es la masa final del filtro, m_i la masa inicial del filtro y V el volumen a filtrar.

$$SST = \frac{m_f - m_i}{V} \quad \text{Ecuación 9}$$

El pH se determinó en un pH-metro Basic 20 (Crison, Barcelona, España). La densidad óptica se analizó empleando un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu, Japón), se midieron las muestras a una longitud de onda de 600 nm en cubetas de poliestireno y se utilizó agua mili-Q como blanco.



Figura 19: Espectrofotómetro UVmini-1240

Para la extracción y el análisis de ectoína intracelular, se utilizó un método modificado basado en el propuesto por Cantera et al [57]. Este consistió en concentrar 4 mL del medio de cultivo en un eppendorf de 2 mL. Para ello se centrifugaron 2 mL de la muestra en un eppendorf a 13500 rpm durante 7 min, se extrajo el sobrenadante, se volvió a llenar el eppendorf con 2 mL, se centrifugó de la misma manera, se volvió a eliminar el sobrenadante y el pellet se almacenó a -20°C .

La segunda parte de la extracción consistió en la rotura celular para liberar la ectoína, y en solubilizar la ectoína en el medio de extracción. Para ello, en los eppendorf con el pellet se añadieron 2 mL de etanol al 70% y varios miligramos de zirconia. Los eppendorf se agitaron en un MINI-beadbeater-16 (Biospec, USA) en 3 ciclos de 1 minuto, esperando 5 minutos entre ciclo para evitar el sobrecalentamiento del aparato. Tras la agitación, se volvió a centrifugar a 13500 rpm durante 2 minutos, filtrándose después 1 mL del sobrenadante con filtros de $0.22\ \mu\text{m}$ y se vertió en viales de HPLC.

El equipo que se utilizó para el análisis de la ectoína fue un HPLC-UV e2695 (Waters, EEUU), con sistema de muestreo automático 717 plus (Waters, EEUU) y equipado con un detector de absorbancia ultravioleta (UV) a 220 nm. La temperatura de medición fue de 40°C . La fase móvil estuvo compuesta por una solución tampón de fosfato ($0.8\text{mM K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $6.0\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) con un caudal de $1\ \text{mL min}^{-1}$. Se realizó una recta de calibrado, a partir de concentraciones de ectoína conocidas y las áreas obtenidas en el HPLC, para llevar a cabo la cuantificación de la ectoína.



Figura 20: HPLC para el análisis de ectoína

Por último, se analizó la cantidad de proteínas que produjo *H. marinus*. Para ello se concentraron 3 mL del medio del reactor en un eppendorf de 1.5 mL, centrifugándose primero 1.5 mL de muestra a 13500 rpm durante 7 minutos, retirándose el sobrenadante y centrifugando 1.5 mL adicionales en las mismas condiciones. Finalmente, se volvió a retirar el sobrenadante y las muestras se conservaron a -20°C .

Para el análisis de la cantidad total de proteínas se utilizó el kit BCA Protein Assay Kit, Thermo scientific 23225 (España). Este método se basa en la colorimetría. Se realizó una recta de calibrado relacionando la densidad óptica con la concentración de las proteínas para poder realizar la cuantificación. Para ello, se prepararon los patrones con diferentes concentraciones ($1000, 500, 250, 125, 25$ y $0 \mu\text{g mL}^{-1}$) en eppendorfs de 2 mL partiendo de una disolución madre de BSA Bovine Serum Albumina que presentaba una concentración de 2 mg mL^{-1} .

A continuación, se procedió a la preparación de las muestras. Sobre los pellets almacenados, se añadió 1 mL del medio mineral al 6% de contenido salino. Con la ayuda de un vortex (ZX3, Velp Scientifica, Italia) se volvió a suspender el pellet. Se preparó el reactivo, que consistía en 1 mL de la solución BCA A (bicinconinato de sodio 0.1g, $\text{NaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.0 g, $\text{C}_4\text{H}_8\text{Na}_2\text{O}_8$ 0.16 g, NaOH 0.4 g y NaHCO_3 0.95 g para 100 mL de disolución) y 20 μL de la solución de BCA B, la cual contiene un 4% de sulfato de cobre (CuSO_4), por cada muestra a analizar. En los eppendorf de 2 mL se añadieron 50 μL de la muestra y 1 mL del reactivo, también se añadió 1 mL del reactivo a los patrones. Se homogenizó con un vortex (ZX3, Velp Scientifica, Italia).



Finalmente, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, produciéndose así la reacción de reducción del Cu^{+2} con las proteínas a Cu^{+1} y variando el color de la disolución. Tras este proceso se dispuso de 10 minutos para medir la densidad óptica de todas las muestras en un espectrofotómetro UVmini-1240 a una longitud de onda de 562 nm, utilizando 1 mL de agua mili-Q como blanco.

3.3 Tratamiento de datos

Los errores típicos de las muestras se han calculado como la desviación estándar de las repeticiones (Ecuación 10), donde N es el número de muestras, \bar{x} es el valor medio de las muestras, x_i es el valor de la muestra y σ es la desviación estándar.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

Ecuación 10

4 Resultados y discusión

4.1 Estudio de la transformación de gases en ectoína en experimentos en lotes

4.1.1 Producción de ectoína con CO₂ e H₂

Con el fin de validar la producción de ectoína con CO₂, se llevó a cabo un experimento en lotes con triplicados biológicos donde se observó el consumo de CO₂ e H₂ y su conversión a ectoína por parte de *H. marinus*. En la Figura 21 se muestra la evolución de la concentración de biomasa como SST y la producción de ectoína en función del tiempo, como la media de las botellas, ya que todas tuvieron un comportamiento muy similar. La biomasa se inoculó a una concentración de $2.93 \pm 0.46 \text{ mg L}^{-1}$ en los triplicados biológicos. Tras 3 días de operación con consumo de gases, la biomasa alcanzó una concentración de $54.59 \pm 2.88 \text{ mg L}^{-1}$. Estos resultados fueron similares a los reportados anteriormente para *H. marinus* en unas condiciones similares ($63.0 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$) [49].

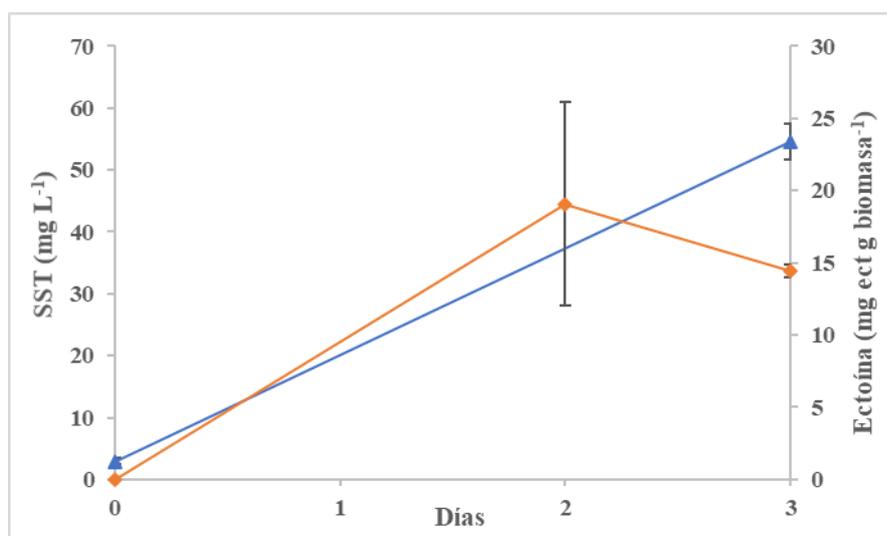


Figura 21: Incremento medio de la biomasa y la ectoína y su desviación para los triplicados biológicos en lotes. ● naranja: representa la ectoína; Δ azul: representa la biomasa en TSS.

Por otro lado, los días 2 y 3 se tomaron muestras de ectoína, las botellas 2 y 3 alcanzaron su máximo en el segundo día, con una producción de 17.83 y 26.65 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$ respectivamente, mientras que la botella 1 alcanzó el máximo en el tercer día con 13.93 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$. En experimentos donde *H. marinus* se creció en unas condiciones de salinidad y bajo una mezcla de gases similares, se obtuvieron unas concentraciones de ectoína de $32.4 \pm 4.2 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$ [49]. En cambio, las botellas produjeron $19.08 \pm 7.04 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$, una cantidad algo menor, pero que pudo ser causada por las pequeñas

diferencias en las condiciones de crecimiento, como por ejemplo, las concentraciones de gases en el espacio de cabezas.

4.1.2 Biotransformación de gases

Las botellas presentaron una concentración inicial de CO_2 de aproximadamente el 10:40% CO_2 : H_2 (v/v). En la Figura 22 se puede observar el consumo de ambos gases en el espacio de cabezas. Los triplicados biológicos siguieron el mismo patrón, empezaron con un consumo significativo de hidrógeno durante los 2 primeros días de crecimiento exponencial, obteniendo una eficacia media de eliminación del 70.13 ± 1.41 % (77.63% de H_2 del total). En el caso del CO_2 , la mayor eliminación se observó en el día 2 de crecimiento exponencial (15.52 ± 1.71 %), eliminando un 15.39 % del CO_2 total del espacio de cabezas. El tercer día la limitada concentración de H_2 , hizo que bajara el consumo de CO_2 . En experimentos donde también se creció *H. marinus* en habientes salinos, el consumo de H_2 fue del 15.7%, muy inferior al obtenido [49], lo que pudo ser debido a la atmósfera de crecimiento, mientras que en otros experimentos donde se fijó CO_2 de manera biológica se obtuvieron fijaciones del 15%, muy parecidas a las de la operación [58].

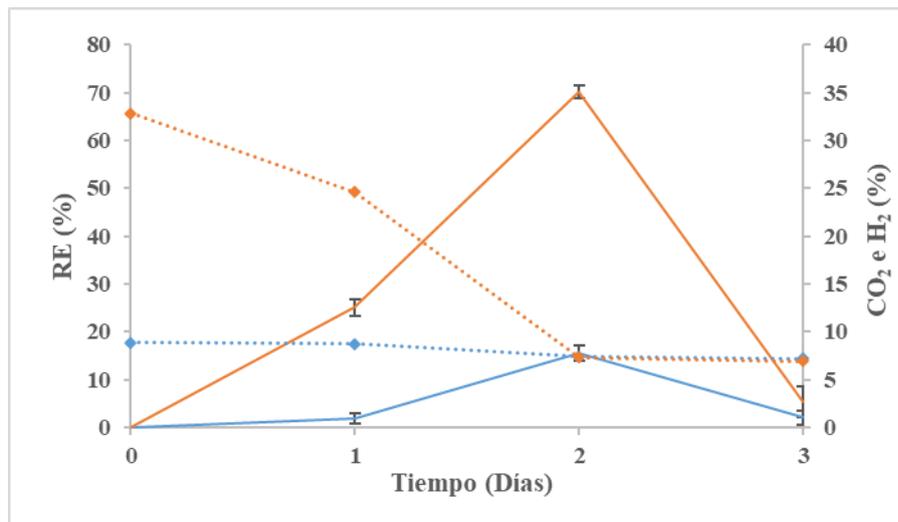


Figura 22: La variación de la eficacia de eliminación (RE) del CO_2 (línea azul continua) y del H_2 (línea naranja continua) y la concentración de CO_2 y H_2 (líneas discontinuas azul y naranja, respectivamente) en el espacio de cabezas frente al tiempo.

Las botellas presentaron una concentración inicial de O_2 de aproximadamente el 10%. En la Figura 23 se puede observar cómo disminuye la concentración de O_2 en el espacio de cabezas con el tiempo, además de mostrar como varía la eficacia de eliminación respecto del tiempo. Las tres botellas siguieron el mismo patrón, tuvieron un consumo significativo durante los 2 primeros días, obteniendo una eficiencia de eliminación media de 78.30 ± 0.60 %, consumiendo casi en su totalidad el O_2 , ya que en esos 2 primeros días se consiguió

eliminar el 85.49% de O_2 , al tercer día, el consumo disminuyó, debido a la escasa concentración de O_2 e H_2 en el espacio de cabezas.

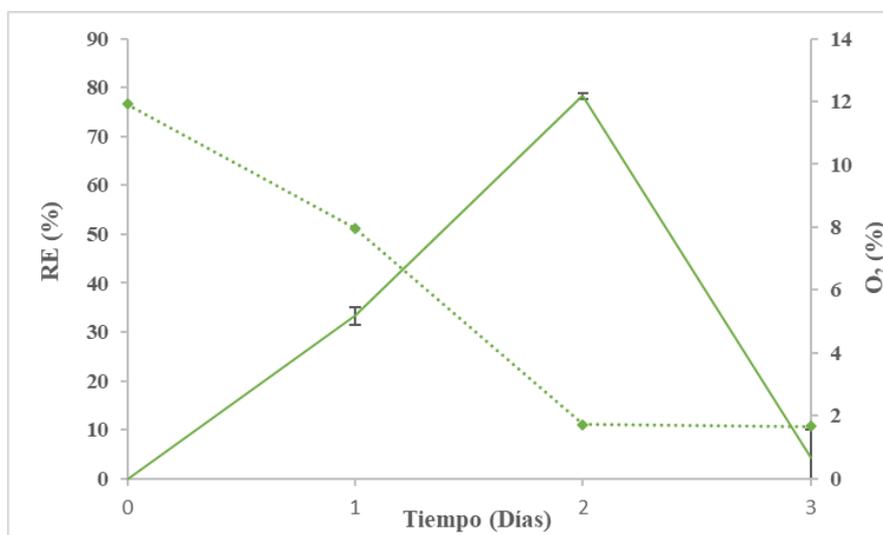


Figura 23: Variación de oxígeno con el tiempo. La línea continua pertenece a la variación de la eficacia de eliminación media del O_2 y la línea discontinua a la concentración de O_2 en el espacio de cabezas frente al tiempo

Con estos resultados se demostró la viabilidad de la bioconversión de CO_2 e H_2 en ectoína usando la cepa pura *H. marinus* y se obtuvo la biomasa necesaria para inocular los reactores y optimizar la estrategia de cultivo y operación.

4.2 Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para la producción de ectoína con H_2 y CO_2 .

El objetivo de este apartado de la investigación era optimizar la estrategia de operación con el fin de mejorar la productividad de biomasa y ectoína usando CO_2 como fuente de carbono, de manera continua, en reactores de tanque agitado, con un 6% de NaCl, e inoculados con *H. marinus*.

4.2.1 Productividad de biomasa y ectoína en la primera operación del reactor

La evolución temporal de la producción de biomasa a lo largo de los 26 días de la primera operación se muestra en la Figura 24, en peso seco durante la primera etapa de operación.

En la primera operación se trabajó con un pH lo más estable posible, ya que afecta de manera directa a las reacciones químicas que realizan las bacterias, con un valor medio de 6.7 ± 0.2 . Otro factor clave es la temperatura, ya que las variaciones pueden suponer



un mayor gasto energético, en definitiva, un incremento de los costes de operación. En esta operación la temperatura media fue de 37.0 ± 0.2 °C.

Durante los primeros 4 días de la primera operación se observó una fase estacionaria donde la concentración de la biomasa se mantuvo en 51.60 ± 1.74 mg L⁻¹ debido a la adaptación de la cepa pura a las condiciones salinas del medio, mediante la producción de osmolitos que la protegieran de las condiciones adversas. A partir del día 5 se observó una fase de crecimiento exponencial donde la bacteria alcanzó una tasa de duplicación de 63.41 h hasta obtenerse valores máximos de biomasa de 160.85 mg L⁻¹ el día 9. Con el fin de mantener el crecimiento exponencial, el día 7 se realizó un reemplazo del 5% del reactor, esto ayudó a mantener el crecimiento exponencial, sin embargo, a partir del día 10 de operación, comenzó el decaimiento celular. Esto fue simultáneo a la subida de los valores de carbono orgánico total a 73.86 mg L⁻¹. Dicho decaimiento estaba probablemente relacionado con la acumulación de metabolitos secundarios producidos durante el crecimiento de la bacteria *H. marinus* en un ambiente de estrés salino, los cuales son tóxicos en concentraciones elevadas e inhiben el crecimiento celular [59], [60].

Por dicha razón, se aumentó la tasa de dilución a 0.1 d⁻¹, durante los días 14 al 20. Esto se hizo con el fin de que la biomasa no fuera lavada, y a su vez se fomentara la eliminación de los metabolitos secundarios tóxicos. Esto promovió la estabilización del crecimiento celular, sin embargo, no se consiguieron los valores máximos alcanzados previamente, con valores de biomasa en esta etapa de 104.66 ± 13.40 mg L⁻¹, observándose de nuevo la acumulación de metabolitos secundarios que alcanzaron valores de 88.30 mg L⁻¹ COT. Por tanto, se incrementó dicha tasa a 0.2 d⁻¹ lo que redujo las concentraciones de metabolitos y promovió el crecimiento estable de la biomasa (110 ± 10 mg L⁻¹) hasta finalizar el experimento. La acumulación de metabolitos tóxicos se ha observado en estudios anteriores, donde se ha visto que valores de COT mayores a 100 mg L⁻¹ limitan el crecimiento celular y en algunos casos inducen la apoptosis bacteriana [60].

En experimentos previos con *H. marinus* se ha observado una concentración de biomasa de 89.3 ± 2.3 mg L⁻¹ en condiciones muy similares de crecimiento [49], muy similar a la obtenida. También, en otros experimentos con diferentes tipos de organismos halófilos de la especie *Halomonas* se obtuvieron concentraciones de biomasa de 236.6 ± 16.4 mg L⁻¹ [59], una concentración mayor a la obtenida, sin embargo dicha bacteria se creció en co-metabolismo de CO₂ y glucosa.

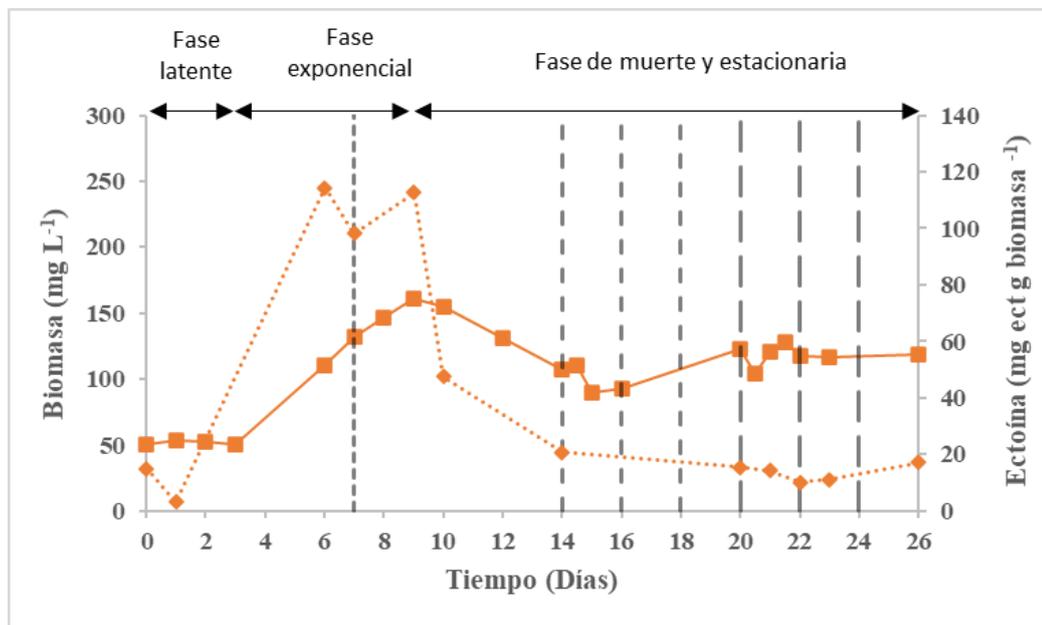


Figura 24: Evolución de la biomasa (SST, línea continua) y de la producción de ectoína (línea discontinua) de la operación 1. La línea vertical en el día 7 corresponde con la tasa de dilución 0.05 d^{-1} , las líneas verticales en los días 14, 16 y 18 corresponden con una tasa de dilución 0.1 d^{-1} y las líneas verticales de los días 20, 22 y 24 corresponden con tasas de dilución de 0.2 d^{-1} .

La evolución temporal de la producción de ectoína a lo largo de los 26 días de la primera operación se muestra en la Figura 24.

En esta primera operación se observó un rápido incremento de ectoína durante los primeros días de operación, ya que en el día 6 se obtuvo la máxima producción $114.35 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1}$, manteniéndose constantes en esos valores hasta el día 10. A partir de ese día, coincidiendo con el decaimiento celular, la producción de ectoína empezó a disminuir, hasta mantenerse estable durante los últimos 12 días de la operación en valores de $12.69 \pm 6.64 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1}$. Las altas concentraciones iniciales se deben a la adaptación de las bacterias al medio salino, ya que se ven sometidas a un choque osmótico provocando la síntesis de osmolitos protectores, como la ectoína, para protegerse contra el estrés salino, produciendo gran cantidad de ectoína en los primeros días [61]. Una vez la concentración de ectoína alcanza su máximo, empezó a disminuir porque se produjo el decaimiento celular provocando que la concentración de ectoína disminuyese. Además, ya no tuvo la necesidad de producir grandes cantidades, porque ya habían alcanzado el equilibrio osmótico, que está por debajo de la concentración máxima, por lo que el excedente lo utilizan como fuente de carbono y energía [61]. Por este motivo las concentraciones al final de experimento se mantuvieron significativamente bajas y estables.

La producción de ectoína durante la primera operación del reactor alcanzó concentraciones máximas de ectoína en la biomasa del 11.40%, con una media de $4.00 \pm 4.28\%$. Dichas concentraciones son mayores que las alcanzadas previamente con



bacterias halófilas crecidas en CO₂ y CH₄ [62] En cambio, también se encontraron experimentos donde bacterias halófilas, *H. salina*, tuvieron una producción máxima de 153.3 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹ (15%) [63], un poco mayor a la detectada en este experimento, pero usando fuentes de carbono ricas, como glucosa y extracto de levadura. De esta primera operación, se dedujo que *H. marinus* podía alcanzar valores de ectoína similares a los producidos con organismos heterótrofos en la industria farmacéutica [64]. Sin embargo, la estrategia de operación debe ser modificada con el fin de mantener el crecimiento exponencial de la bacteria y altas productividades de ectoína a lo largo del tiempo y así promover la resiliencia operacional en su posterior escalado.

4.2.2 Capacidad de bioconversión del CO₂ e H₂ por *H. marinus* en la primera operación del reactor

Se utilizaron los parámetros de capacidad de eliminación media (CEM) (g CO₂ m⁻³ L⁻¹), y eficacia de eliminación (RE) (%) para analizar la eficacia en el consumo de los gases. La capacidad de eliminación informa de la cantidad de degradación del compuesto por unidad de tiempo y volumen, mientras que la eficacia de eliminación proporciona cuánto ha disminuido un compuesto en porcentaje.

4.2.2.1 Evolución del CO₂ y H₂

En la Figura 25 y en la Figura 26 se pueden observar la evolución de la capacidad de eliminación y la eficacia de eliminación del CO₂ e H₂ frente al tiempo respectivamente, en la primera operación. En la Figura 25 también se puede apreciar la evolución del pH.

La capacidad y la eficacia de eliminación del CO₂ aumentaron hasta valores de 19.73 ± 0.78 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y 16.83 ± 0.40 % CO₂ en los primeros 4 días, lo cual no se relacionó con el crecimiento exponencial de la biomasa sino con la estabilización de los carbonatos y pH del reactor (Figura 25). Cuando empezó el crecimiento exponencial los valores se mantuvieron estables en torno a 17.91 ± 1.36 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y 17.96 ± 0.89 % hasta el día 10, donde hubo una bajada de la CEM de CO₂ hasta valores de 12.48 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y un RE de 11.09 %. Esta disminución pudo ser debida a la acumulación de los metabolitos secundarios excretados al medio durante la fase de crecimiento exponencial, lo que provocó una acidificación del medio, desplazando el equilibrio de algunas reacciones, por ejemplo, la descomposición de carbonato, liberando el CO₂ disuelto [49]. A partir del día 10 empezó a haber grandes oscilaciones en ambos parámetros producidas por los reemplazos. Al añadir medio nuevo se rompía el equilibrio entre los carbonatos, por lo que, para volver a alcanzar el equilibrio en ambas fases, se liberaba o se atrapaba CO₂, produciéndose grandes oscilaciones en los últimos días del reactor.

En experimentos donde se han crecido bacterias halófilas, diferentes tipos de *Halomonas*, en condiciones similares se consiguió una capacidad de eliminación de 23.9 ± 2.9 g CO₂

$\text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$ [59]. En la operación se obtuvo una capacidad de eliminación de $16.40 \pm 1.18 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, un valor no muy lejano del bibliográfico. Las condiciones de crecimiento y el tipo de microorganismo influyeron en estos resultados.

En el caso del hidrógeno, la eliminación se mantuvo estable hasta el día 3 en $2.47 \pm 0.06 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $13.62 \pm 0.12 \%$. En la fase de crecimiento exponencial de la biomasa, la degradación de H_2 incrementó hasta un máximo de $4.32 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y 22.41% , en el día 6, manteniéndose estable hasta el día 10 en $3.81 \pm 0.63 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $20.08 \pm 1.75 \%$. Del día 10 hasta el final de experimento hubo grandes oscilaciones debido a los reemplazos producidos en el reactor. Los reemplazos rompen el equilibrio del hidrógeno, solubilizando la cantidad necesaria de H_2 para volver a alcanzar el equilibrio en ambas fases, variando los parámetros.

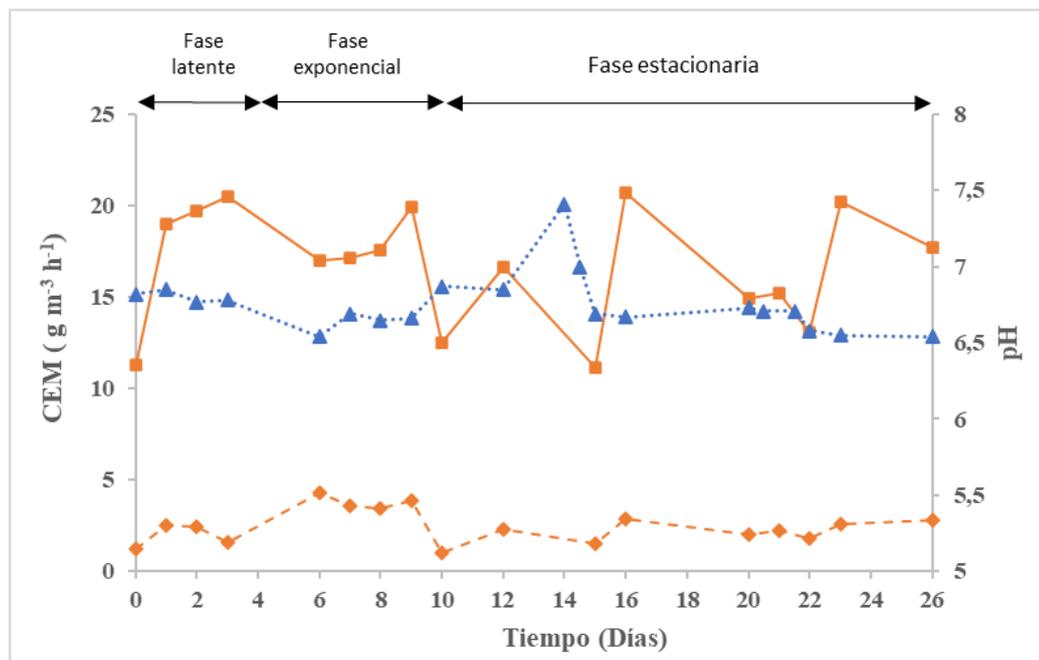


Figura 25: Evolución de la capacidad de eliminación (CEM) del CO_2 (línea naranja continua) y del H_2 (línea naranja discontinua) frente al tiempo, y evolución del pH (línea azul) en la operación.

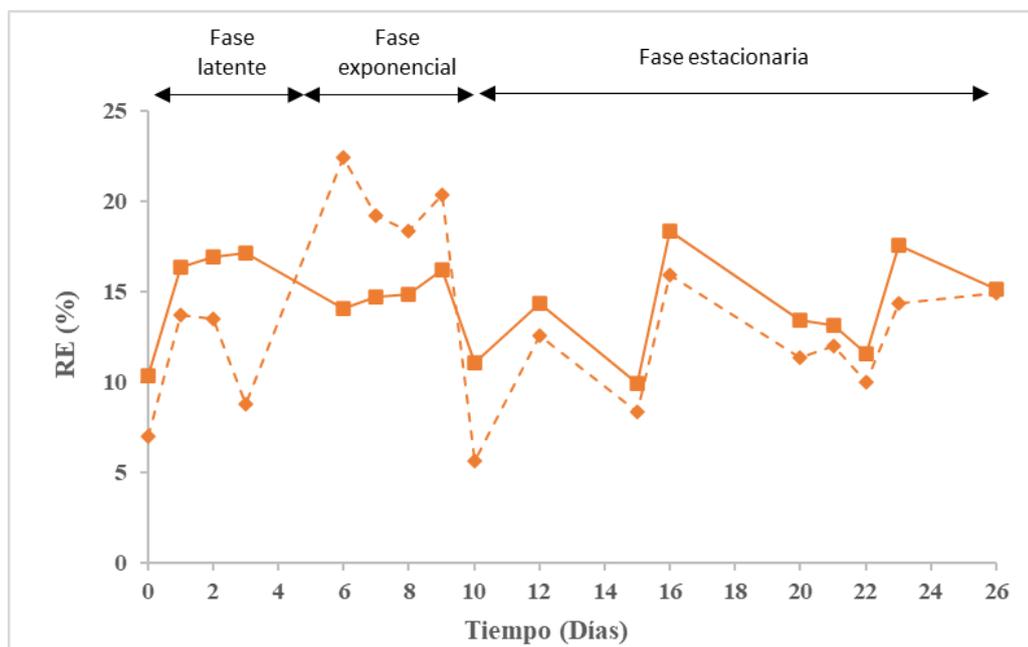


Figura 26: Evolución de la eficacia de eliminación (RE) del CO₂ y H₂ de la primera operación. La línea continua corresponde a la RE del CO₂, mientras que la línea discontinua corresponde a la RE del H₂

4.2.3 Productividad de biomasa y ectoína en la segunda operación del reactor

Con el objetivo de mejorar las productividades de ectoína, se llevó a cabo una nueva operación del reactor donde se impusieron mayores tasas de dilución con el fin de mantener altas concentraciones de biomasa en crecimiento exponencial y evitar el aumento de la concentración de COT, provocada por los metabolitos tóxicos. La evolución temporal de la concentración de biomasa a lo largo de los 26 días de la segunda operación se muestra en la Figura 27.

En la segunda operación también se trabajó con un pH muy cercano al neutro, de 6.7 ± 0.1 . Para no aumentar los costes de operación, se trabajó con una temperatura media en el interior del reactor de 31.2 ± 0.2 °C.

La concentración inicial de biomasa fue de 22.37 mg L^{-1} , menor que la inicial en la operación 1, manteniéndose estable durante los primeros 5 días ($22.72 \pm 0.49 \text{ mg L}^{-1}$), debido a la adaptación al medio. A partir del sexto día, la biomasa creció exponencialmente llegando a valores de 40.80 mg L^{-1} en el día 6. Con el fin de aumentar la velocidad de crecimiento y eliminar cualquier metabolito tóxico, en el día 7 se realizó un reemplazo de 500 mL, por lo que el tiempo de duplicación de la biomasa disminuyó hasta 29.90 h, y la biomasa creció exponencialmente hasta alcanzar su máximo de 149.57



mg L⁻¹ en el día 11. Durante los siguientes días se realizaron reemplazos al reactor con una tasa de dilución de 0.5 d⁻¹ con el fin de diluir la concentración de metabolitos, obteniendo una concentración de 14.85 ± 1.99 mg COT L⁻¹, y mantener el crecimiento exponencial, así se obtuvo un tiempo de duplicación medio de 22.79 ± 6.17 h. Sin embargo, tras el reemplazo del día 13 se observó un decaimiento celular, alcanzando un mínimo de biomasa de 37.19 mg L⁻¹ el día 14. Esto fue debido a que al llevar a cabo la tasa de dilución de 0.5 d⁻¹, el pH bajó hasta valores de 6.37, produciendo un choque osmótico celular, llevando a la apoptosis de la mayor parte del cultivo, por lo que las bacterias tuvieron que readaptarse al medio. El día 20 se consiguió incrementar de nuevo la biomasa a valores de 107.94 mg L⁻¹. El reemplazo realizado el día 23 provocó de nuevo el crecimiento exponencial, sin embargo, produjo un lavado de biomasa y las concentraciones máximas obtenidas fueron la mitad de las observadas al inicio de la operación (74.48 ± 19.48 mg L⁻¹), seguramente por el daño celular provocado por el bajo pH y la acumulación de biomasa de edad celular avanzada.

En experimentos previos donde *H. marinus* creció en condiciones muy parecidas, tanto mezcla de gases en el espacio de cabeza como salinidad, se obtuvo una concentración de biomasa de 89.3 ± 2.3 26 mg L⁻¹ [49]. En este estudio se obtuvieron concentraciones de biomasa mayores que las reportadas. En cambio, entre ambas operaciones, la operación 1 presentó una mayor concentración media de biomasa, pudo ser debido a que partió de valores de biomasa mayores que la segunda operación, ya que ambas poseen un máximo muy parecido. Por otro lado, la operación 2 tuvo una velocidad de duplicación mucho menor, indicando que tuvo un crecimiento más activo. Esto se pudo deber a la tasa de dilución de la operación 2, 0.5 d⁻¹, que consiguió diluir lo suficiente los metabolitos, como muestran las menores concentraciones de COT en esa operación, además de añadir nuevos nutrientes, optimizando el crecimiento exponencial.

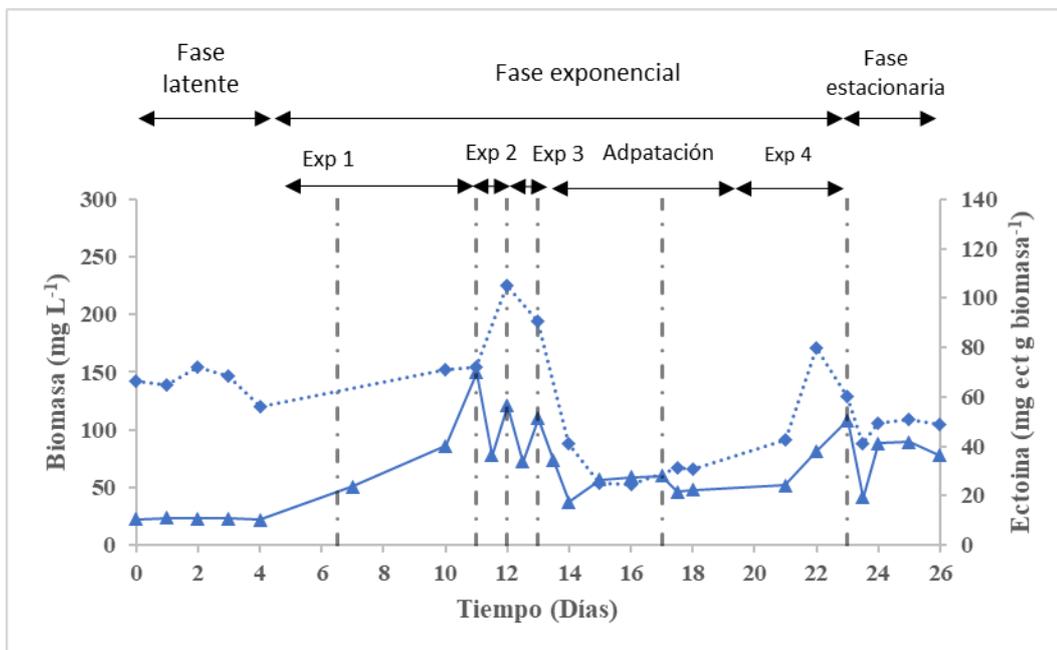


Figura 27: Evolución de la biomasa (SST, línea continua) y ectoína (línea discontinua) en la operación 2. Las líneas verticales corresponden con la tasa de dilución de 0.5 d⁻¹.

La evolución temporal de la producción de ectoína a lo largo de los 26 días de la primera operación se muestra en la Figura 27.

En la segunda operación se observó un leve incremento de la ectoína durante los primeros 3 días, causado por la producción de osmolitos por el choque osmótico, como manera de adaptación de las bacterias al medio salino. La producción de ectoína descendió hasta el día 4. Coincidiendo con el inicio del crecimiento exponencial, la producción de ectoína también aumentó, llegando a su máximo el día 12 con una producción de 105.19 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹. Sin embargo, debido al daño celular provocado el día 13 por el pH del medio, el contenido de ectoína se vio reducido debido a la apoptosis celular, llegando a una producción mínima de 24.57 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹ en el día 16. La recuperación de la biomasa en los días consecutivos promovió la acumulación de ectoína, hasta llegar a valores de 79.96 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹ en el día 21, coincidiendo con el momento en el que la biomasa volvió a crecer de manera activa. Durante los últimos 3 días del experimento la producción se mantuvo estable en valores de 47.06 ± 5.44 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹.

En la segunda operación se han alcanzado concentraciones de ectoína en la biomasa del 10.5% y una media del 5.57 ± 2.19%, superiores a las alcanzadas por otros organismos halófilos crecidos con CO₂ y H₂ [59]. Además, se han alcanzado valores de ectoína algo mayores que en otros experimentos con *H. marinus*, 84.6 ± 3.6 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹ [49]. Asimismo, también se han obtenido concentraciones de ectoína mayores que las obtenidas por bacterias metanótrofas, como *Methylotheobacterium alcaliphilum*, con una concentración de 75 mg_{ect} g_{biomasa}⁻¹, cuya única fuente de carbono es el metano (CH₄) [65].



Por el contrario, las bacterias que utilizan glucosa como fuente de carbono tienen una producción de ectoína mucho mayor, en torno al 150-250 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$ [64], pero los costes de operación son muy superiores, ya que la glucosa es más cara que el CO_2 . La producción de ectoína de microorganismos modificados genéticamente aumenta hasta valores de 765 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$, pero en la industria cosmética hay un rechazo a la utilización de estos microorganismos [66]. De esta operación se deduce que la mejor estrategia de operación se basa en altas tasas de dilución, esto permite mantener a las bacterias en crecimiento exponencial, así como la transcripción de los genes de la ectoína [67], promoviendo de esta manera altas productividades del compuesto de interés. Durante la primera operación se alcanzaron productividades de 0.10 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$, mientras que en la segunda operación se alcanzaron productividades de ectoína más altas de 0.19 $\text{mg}_{\text{ect}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Sin embargo, quedan lejos de las productividades alcanzadas por otras bacterias halófilas heterótrofas como *H. elongata* que obtuvo 0.22 $\text{g}_{\text{ect}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$, *H. salina* con una productividad de 0.33 $\text{g}_{\text{ect}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ o *Escherichia Coli*, la cual alcanzó una productividad de ectoína de 0.04 $\text{g}_{\text{ect}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ [67].

Durante la segunda operación también se analizaron la cantidad de proteínas producidas por *H. marinus* durante su ciclo de vida, como otra manera de analizar el crecimiento de la misma. En la Figura 28 se muestra la evolución de la concentración de proteínas a lo largo de la operación. Al inicio, la concentración de proteínas se mantuvo constante en torno a $10.56 \pm 3.35 \text{ mg L}^{-1}$, lo que significaba que el $46.44 \pm 14.58\%$ de la biomasa estaba compuesta por proteínas, debido al escaso crecimiento que hubo. Tras el día 4 empezó a aumentar la concentración hasta que alcanzó máximos de 92.07 mg L^{-1} en el día 11, donde el 61.55% de la biomasa era proteína, manteniéndose constantes durante 3 días. La concentración de proteínas disminuyó en el día 14 hasta 35.62 mg L^{-1} , coincidiendo con la parada de crecimiento, permaneciendo más o menos estable hasta el día 22, donde la concentración aumentó a valores de 74.96 mg L^{-1} , coincidiendo con la aceleración del crecimiento. En los últimos 3 días se alcanzó la fase estacionaria y se produjo la lisis celular, provocando que la concentración de proteínas disminuyera, obteniéndose una media de $51.18 \pm 15.75 \text{ mg L}^{-1}$. La biomasa finalizó el experimento con un $72.04 \pm 8.61\%$ de proteínas. Para bacterias halófilas, se han observado concentraciones proteicas en torno al 50-60% de la biomasa [68], las variaciones durante el experimento pudieron deberse a la cantidad de nutrientes disponibles en el medio o a la velocidad de crecimiento a la que se encontrase [69].

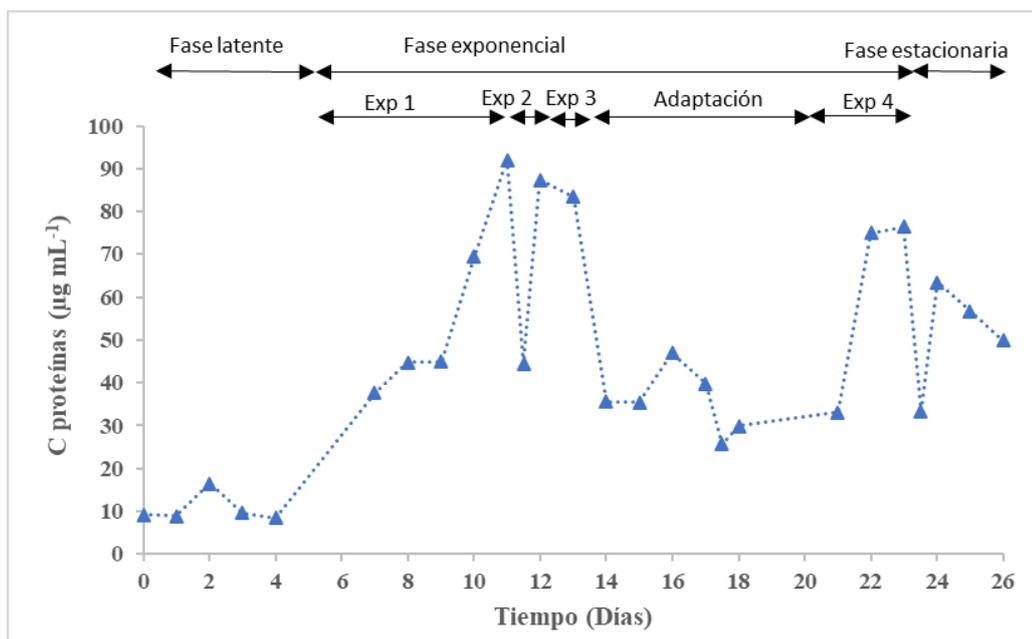


Figura 28: Evolución de la concentración de proteínas en la segunda operación

4.2.4 Capacidad de bioconversión del CO₂ e H₂ por *H. marinus* en la segunda operación del reactor

Se utilizaron la capacidad de eliminación (CEM) y la eficacia de eliminación (RE) para analizar la capacidad de consumo en la segunda operación.

4.2.4.1 Evolución del CO₂ y H₂

Como se puede observar en la Figura 29 donde se muestran la evolución de la capacidad de eliminación del CO₂ e H₂ frente al tiempo y la evolución del pH en la operación, mientras que en la Figura 30 se muestra la eficacia de eliminación del CO₂ e H₂ en la segunda operación.

El primer día de la operación la capacidad de eliminación del CO₂ y la eficacia de eliminación del CO₂ disminuyeron y se mantuvieron estables en niveles de 0.95 ± 1.37 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y $0.68 \pm 0.98\%$ hasta el día 4. Empezó a aumentar la eliminación en el día 5, a raíz de la aceleración del crecimiento de la biomasa, hasta alcanzar la máxima eliminación en el día 8 (10.47 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y 7.51%). Tras alcanzar el máximo, el consumo empezó a decaer, hasta llegar al consumo mínimo el día 15 (0.62 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ y 0.44%). Esta bajada fue provocada por una bajada de pH, hasta un valor de 6.37, rompiendo el equilibrio de H₂CO₃, liberando el CO₂ disuelto, ya que esta reacción es estable hasta un pH de 6.35 [49]. El consumo volvió a aumentar a partir del día 18, recuperándose el crecimiento. Los

últimos días del reactor el consumo se mantuvo constante en valores de $3.17 \pm 1.10 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $2.39 \pm 0.96 \%$.

En experimentos donde se ha fijado CO_2 de manera biológica se han obtenido valores similares o menores al obtenido en la operación [70]. En la operación se obtuvo una capacidad de eliminación del CO_2 de $3.00 \pm 5.45 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, un valor muy lejano al de la operación anterior, lo cual se relaciona con la oscilación del pH.

El consumo de hidrógeno en la segunda operación se mantuvo estable durante los primeros 4 días en $0.48 \pm 0.26 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $2.01 \pm 1.04 \%$, pero siempre con una tendencia a disminuir la eliminación de H_2 , debido al escaso crecimiento. En el día 5 comenzó la eliminación de H_2 como consecuencia del inicio de la fase de crecimiento exponencial, en el día 12 se alcanzó la máxima eliminación con una capacidad de eliminación de $4.90 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y una eficacia del 20.62 %. A partir de ese día decayó el consumo hasta alcanzar el mínimo en el día 14 con $0.43 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y 1.91 %, coincidiendo con el parón en el crecimiento. La capacidad de eliminación y la eficacia se mantuvieron estables los siguientes días en $0.59 \pm 0.22 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $2.50 \pm 0.92\%$, aumentando ligeramente en el día 20 cuando se relanzó el crecimiento y manteniéndose constante durante los últimos 2 días de la operación en $1.33 \pm 0.04 \text{ g H}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $5.75 \pm 0.33 \%$.

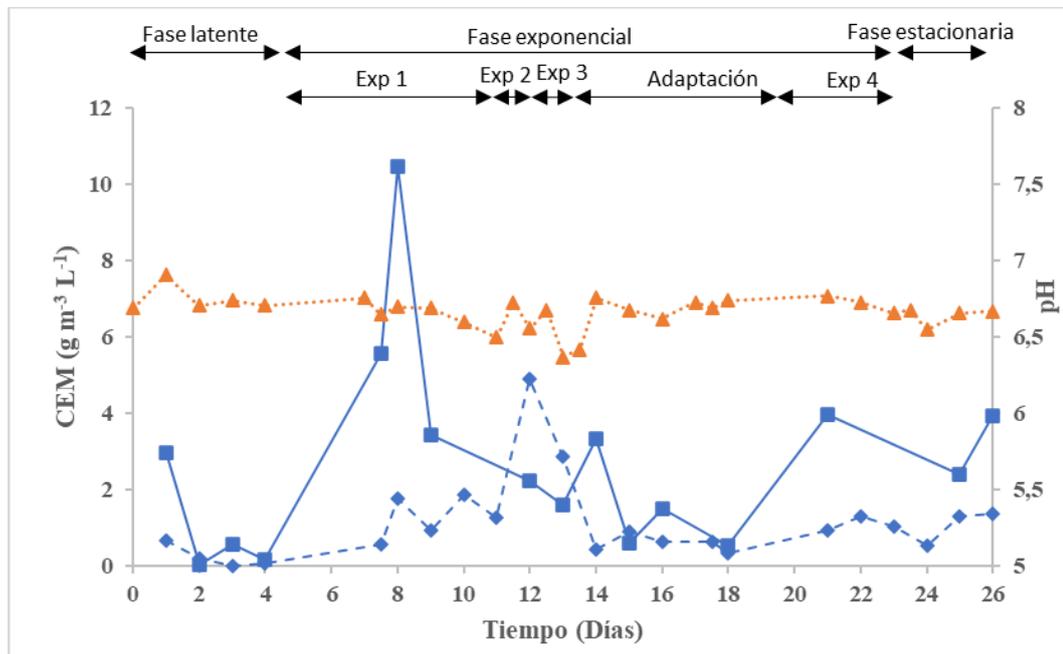


Figura 29: Evolución de la capacidad de eliminación (CEM) del CO_2 (línea azul continua) y del H_2 (línea azul discontinua) y del pH (línea naranja) frente al tiempo de la segunda operación.

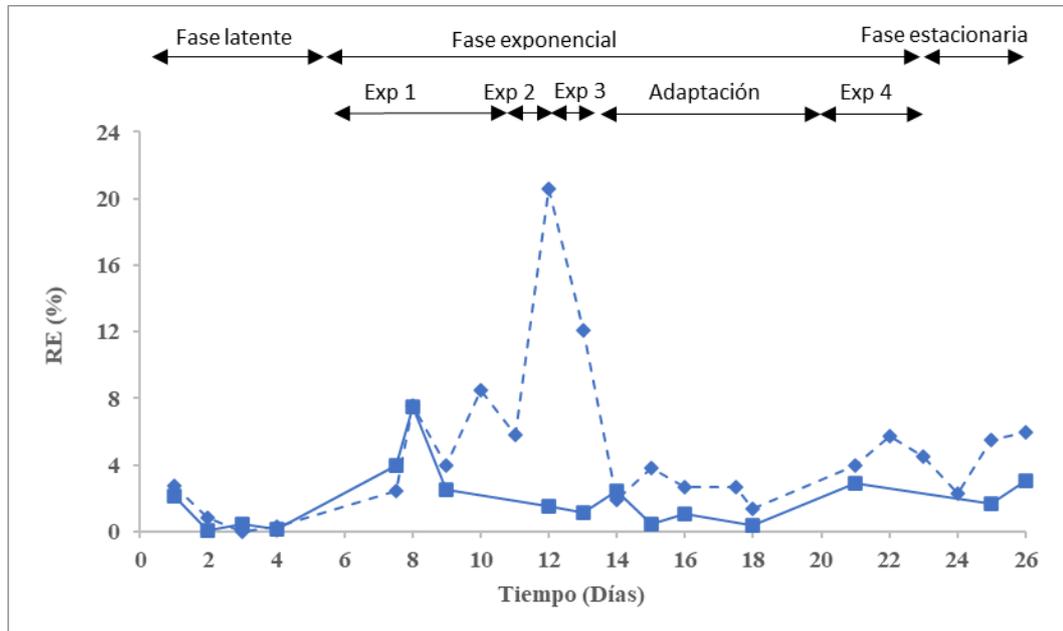


Figura 30: Evolución de la eficacia de eliminación (RE) del CO₂ (línea continua) y del H₂ (línea discontinua) de la segunda operación.



5 Conclusiones

Este experimento ha permitido estudiar tanto la viabilidad como la optimización de la producción de ectoína en reactores de tanque agitado de mezcla perfecta a partir de un flujo de gases (CO_2 , H_2 , O_2 y N_2) continuo, siendo el CO_2 la única fuente de carbono y utilizando la bacteria *Hydrogenovibrio marinus*.

En los experimentos en lotes, *H. marinus* fue capaz de consumir un 18.88% del CO_2 para producir $19.08 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1}$. Considerándose por tanto viable la posibilidad de producir de ectoína a partir de CO_2 como única fuente de carbono.

En las operaciones en continuo del reactor se optimizó la tasa de dilución. En la primera operación se trabajó con varias tasas de dilución: se comenzó con 0.05 d^{-1} , para más tarde aumentarse a 0.1 d^{-1} y finalmente terminar en un valor de 0.2 d^{-1} . Las tasas fueron aumentado al no conseguirse el objetivo de prolongar la fase de crecimiento exponencial, pues los primeros valores no eran capaces de disminuir las altas concentraciones del carbono orgánico total, inhibidoras del crecimiento y producidas por la acumulación de metabolitos secundarios. Es por ello que el aumento de la tasa de dilución hasta 0.5 d^{-1} en la segunda operación no sólo consiguió alargar la fase de crecimiento exponencial, sino también potenciar el crecimiento, diluyendo la concentración de metabolitos tóxicos y aportando mayores cantidades de nutrientes.

Por otro lado, durante la primera operación se obtuvo una concentración de ectoína de $39.97 \text{ mg}_{\text{ect}} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1}$. Gracias a la optimización en las condiciones de crecimiento del reactor en la segunda operación, se consiguió aumentar la producción de ectoína en un 41.85%. Cabe destacar que la productividad de ectoína ($\text{mg}_{\text{ect}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de la segunda operación también aumentó un 89.32% con respecto a la primera.

Los resultados obtenidos confirman la viabilidad de la producción de ectoína a partir de *H. marinus* en reactores continuos de tanque agitado de mezcla perfecta. Lo cual permite abrir un gran frente a futuras investigaciones, pues es necesario seguir optimizando el proceso para maximizar aún más la producción de ectoína y reducir los costes de operación.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



6 Bibliografía

- [1] Environmental Protection Agency, “Greenhouse Gas Emissions Sources of GHG Emissions and Removals Overview Carbon Dioxide Methane Nitrous Oxide Fluorinated Gases Overview of Greenhouse Gases,” 2021. [Online]. Available: <https://epa.gov/ghgemissions/inv>
- [2] S. DE Estado De Medio Ambiente Dirección General De Calidad Y Evaluación Ambiental, “MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO,” 2022. [Online]. Available: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736164439&menu=resultados&idp=12547355765814https://www.ree.es/es/balance-diario/nacional/2022/12/31
- [3] E. De la Cruz Alonso and L. J. Miguel González, “TFG-I-546,” 2016.
- [4] international energy agency, “CO2 Emissions in 2022,” 2022. [Online]. Available: www.iea.org
- [5] E. De la Cruz Alonso and L. J. Miguel González, “TFG-I-546,” 2016.
- [6] EEA, “EEA greenhouse gases — data viewer — European Environment Agency.” Accessed: Nov. 26, 2023. [Online]. Available: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/data-viewers/greenhouse-gases-viewer>
- [7] S. DE Dirección General De Calidad Y Evaluación Ambiental, “INVENTARIO NACIONAL DE EMISIONES A LA ATMÓSFERA EMISIONES DE GASES DE EFECTO INVERNADERO Serie 1990-2021 INFORME RESUMEN MINISTERIO PARA LA TRANSICIÓN ECOLÓGICA Y EL RETO DEMOGRÁFICO,” 2021, Accessed: Nov. 26, 2023. [Online]. Available: <http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1>.
- [8] “Cambio climático: lo que está haciendo la UE - Consilium.” Accessed: Mar. 12, 2024. [Online]. Available: <https://www.consilium.europa.eu/es/policias/climate-change/>
- [9] “La Moncloa. 19/05/2020. Proyecto de ley de Cambio Climático y Transición Energética [Consejo de Ministros].” Accessed: Mar. 12, 2024. [Online]. Available: <https://www.lamoncloa.gob.es/consejodeministros/Paginas/enlaces/190520-enlace-clima.aspx>
- [10] “Estrategia regional de cambio climático | Medio Ambiente | Junta de Castilla y León.” Accessed: Mar. 12, 2024. [Online]. Available: <https://medioambiente.jcyl.es/web/es/planificacion-indicadores-cartografia/estrategia-regional-cambio-climatico.html>



- [11] J. Salvador, "Tecnologías de captura y almacenamiento de dióxido de carbono," 2017. [Online]. Available: www.ecorfan.org/bolivia
- [12] K. Wiranarongkorn, K. Eamsiri, Y. S. Chen, and A. Arpornwichanop, "A comprehensive review of electrochemical reduction of CO₂ to methanol: Technical and design aspects," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 71. Elsevier Ltd, May 01, 2023. doi: 10.1016/j.jcou.2023.102477.
- [13] J. Gibbins and H. Chalmers, "Carbon capture and storage," *Energy Policy*, vol. 36, no. 12, pp. 4317–4322, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.enpol.2008.09.058.
- [14] J. Salvador, "Tecnologías de captura y almacenamiento de dióxido de carbono," 2017. [Online]. Available: www.ecorfan.org/bolivia
- [15] J. Olgúin Eugenia, Acién Fernández Gabriel, de Philippis Roberto, Morales Avendaño Ever, and Moreira Soares Hugo, "Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal," 2011.
- [16] T. Patterson, S. Esteves, R. Dinsdale, and A. Guwy, "An evaluation of the policy and techno-economic factors affecting the potential for biogas upgrading for transport fuel use in the UK," *Energy Policy*, vol. 39, no. 3, pp. 1806–1816, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.ENPOL.2011.01.017.
- [17] B. Morero, E. Gropelli, and E. A. Campanella, "Revisión de las principales tecnologías de purificación de biogás," 2010.
- [18] L. Novo and M. Isabel, "ES 2 754 801 T3," 2011.
- [19] A. Luis and L. Fuentes, "Capítulo 2_230410."
- [20] R. Maldonado, B. Acosta, J. Osorio, D. Soto, and Y. S. Zeppieri, "SELECCIÓN Y DISEÑO DE UN ESQUEMA DE SEPARACIÓN CH₄-CO₂ DE UNA CORRIENTE DE BIOGÁS SELECTION AND DESIGN OF A SCHEME OF CH₄-CO₂ SEPARATION OF A BIOGAS STREAM," 2014.
- [21] O. Jönsson, A. Wellinger, A. Rudolf BRAUN, and D. Jens Bo HOLM-NIELSEN, "Biogas Upgrading to Vehicle Fuel Standards and Grid Injection Biogas Upgrading IEA Bioenergy Content Biogas Upgrading Task 37-Energy from Biogas and Landfill Gas BY THE END OF 2006 THE FOLLOWING NATIONS WERE MEMBERS OF TASK 37," 2006. [Online]. Available: www.eia.doe.gov
- [22] N. Muscorum, G. Abadía, J. Tutoras, L. Fernández, and R. Ángeles Torres, "Optimización del proceso de eliminación de CO₂ y acumulación simultánea de PHAs en."



- [23] T. Myers, "Proyecto I+D+i «Prueba de Concepto» 2021_ La explotación de las matemáticas para ayudar en el diseño de columnas de adsorción _ Agencia Estatal de Investigación," 2023.
- [24] R. Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal, "Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal".
- [25] M. Girard, A. A. Ramirez, G. Buelna, and M. Heitz, "Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry-Influence of the methane and nitrogen concentrations," *Chemical Engineering Journal*, vol. 168, no. 1, pp. 151–158, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cej.2010.12.054.
- [26] J. D. Semrau, "Bioremediation via methanotrophy: Overview of recent findings and suggestions for future research," *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, no. OCT. Frontiers Research Foundation, 2011. doi: 10.3389/fmicb.2011.00209.
- [27] J. C. López, G. Quijano, T. S. O. Souza, J. M. Estrada, R. Lebrero, and R. Muñoz, "Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 6. pp. 2277–2303, Mar. 2013. doi: 10.1007/s00253-013-4734-z.
- [28] S. Delgado, L. Jimena, L. Fernández, M. Torre, and C. Ruiz, "Co-producción de ectoína y PHB durante el tratamiento de emisiones diluidas de metano Valladolid, julio del 2017 Tutor 1: Tutor 2: Cotutor," 2017.
- [29] "Biofiltración – Estructplan." Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: <https://estructplan.com.ar/biofiltracion/>
- [30] "Tipos de Biorreactores | Cultiply." Accessed: Jun. 10, 2024. [Online]. Available: <https://cultiply.net/tipos-de-biorreactores/>
- [31] J. C. López, G. Quijano, R. Pérez, and R. Muñoz, "Assessing the influence of CH₄ concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure," *J Environ Manage*, vol. 146, pp. 116–123, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jenvman.2014.06.026.
- [32] A. Enrich-Prast, D. Bastviken, P. Crill, A. L. Santoro, C. N. Signori, and A. M. Sanseverino, "Chemosynthesis," *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.09054-0.
- [33] Junta de Andalucía, "CONTENIDOS anterior-(11/11)-siguiente." [Online]. Available: https://www.juntadeandalucia.es/averroes/centros-tic/14700420/helvia/aula/archivos/repositorio/0/59/html/datos/alumno/2bachillerato/Fisiologia_celular/contenidos11.htm



- [34] Z. Liu, S. Shi, Y. Ji, K. Wang, T. Tan, and J. Nielsen, "Opportunities of CO₂-based biorefineries for production of fuels and chemicals," *Green Carbon*, vol. 1, no. 1, pp. 75–84, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.greenca.2023.09.002.
- [35] S. Cantera, D. Tamarit, P. J. Strong, I. Sánchez-Andrea, T. J. G. Ettema, and D. Z. Sousa, "Prospective CO₂ and CO bioconversion into ectoines using novel microbial platforms," *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, vol. 21, no. 3. Springer Science and Business Media B.V., pp. 571–581, Sep. 01, 2022. doi: 10.1007/s11157-022-09627-y.
- [36] A. Anand, S. Raghuvanshi, and S. Gupta, "Trends in Carbon Dioxide (CO₂) Fixation by Microbial Cultivations," *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*, vol. 7, no. 2. Springer Nature, pp. 40–47, Jun. 01, 2020. doi: 10.1007/s40518-020-00149-1.
- [37] J. Antonio and D. Romero, "MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS. VIDA MICROBIANA MÁS ALLÁ DE SUS CONDICIONES ÓPTIMAS Memoria que presenta," 2021.
- [38] N. Ramírez D., J. A. Serrano R., and H. Sandoval T., "Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas," *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 37, no. 3, pp. 56–71, 2006, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937307>
- [39] R. María Oliart-Ros, Á. Manresa-Presas, M. Guadalupe Sánchez-Otero, and A. Para, "Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development," 2016, [Online]. Available: http://3.bp.blogspot.com/_bZzczPfGaOA/S_g6jEOEhQI/AAAAAAAAABg/9exegm51Tm8/s1600/cartaz-biotechnology1.jpghttps://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/18/15/af/1815af764c0018310057cd5831de6e8c.jpg
- [40] G. Lentzen and T. Schwarz, "Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, no. 4. pp. 623–634, Oct. 2006. doi: 10.1007/s00253-006-0553-9.
- [41] P. J. Strong, M. Kalyuzhnaya, J. Silverman, and W. P. Clarke, "A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation," *Bioresource Technology*, vol. 215. Elsevier Ltd, pp. 314–323, Sep. 01, 2016. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.099.
- [42] B. Meena, L. Anburajan, N. V. Vinithkumar, R. Kirubakaran, and G. Dharani, "Molecular and functional characterization of major compatible solute in Deep Sea halophilic actinobacteria of active volcanic Barren Island, Andaman and



- Nicobar Islands, India,” in *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, Elsevier, 2020, pp. 253–267. doi: 10.1016/B978-0-12-818322-9.00019-8.
- [43] “Ectoína - Wikipedia, la enciclopedia libre.” Accessed: Dec. 20, 2023. [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Ecto%C3%ADna>
- [44] F. Orhan, E. Ceyran, and A. Akincioglu, “Optimization of ectoine production from *Nesterenkonia xinjiangensis* and one-step ectoine purification,” *Bioresour Technol*, vol. 371, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2023.128646.
- [45] S. Herreras and B. Rodríguez, “Tutor,” 2023.
- [46] A. A. Carmona-Martínez *et al.*, “Elucidating the key environmental parameters during the production of ectoines from biogas by mixed methanotrophic consortia,” *J Environ Manage*, vol. 298, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113462.
- [47] R. Graf, S. Anzali, J. Buenger, F. Pfluecker, and H. Driller, “The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant,” *Clin Dermatol*, vol. 26, no. 4, pp. 326–333, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.002.
- [48] J. María, M. Cánovas, and V. Bernal Sánchez, “UNIVERSIDAD DE MURCIA,” 2015.
- [49] S. Cantera, F. Di Benedetto, B. F. Tumulero, and D. Z. Sousa, “Microbial conversion of carbon dioxide and hydrogen into the fine chemicals hydroxyectoine and ectoine,” *Bioresour Technol*, vol. 374, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2023.128753.
- [50] M. Liu, H. Liu, M. Shi, M. Jiang, L. Li, and Y. Zheng, “Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals,” *Microbial Cell Factories*, vol. 20, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s12934-021-01567-6.
- [51] W. C. Chen, C. C. Hsu, L. F. Wang, J. C. W. Lan, Y. K. Chang, and Y. H. Wei, “Exploring useful fermentation strategies for the production of hydroxyectoine with a halophilic strain, *Halomonas salina* BCRC 17875,” *J Biosci Bioeng*, vol. 128, no. 3, pp. 332–336, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.02.015.
- [52] A. Bankar, S. Patil, M. Shinde, S. Shinde, and B. Kowligi, “Potential of microbial extremophiles for biotechnological applications: An overview,” in *Microbial Extremozymes: Novel Sources and Industrial Applications*, Elsevier, 2021, pp. 89–109. doi: 10.1016/B978-0-12-822945-3.00016-6.



- [53] H. Nishihara, Y. Igarashi, and T. Kodama, "Hydrogenovibrio marinus Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium," 1991.
- [54] H. Nishihara, Y. Igarashi, and T. Kodama, "Growth Characteristics and High Cell-Density Cultivation of a Marine Obligately Chemolithoautotrophic Hydrogen-Oxidizing Bacterium Hydrogenovibrio marinus Strain MH-110 under a Continuous Gas-Flow System," 1991.
- [55] "¿Por qué se usa helio en cromatografía de gases? | Air Liquide España - Gases industriales." Accessed: May 02, 2024. [Online]. Available: <https://es.airliquide.com/soluciones/calibracion/gases-para-cromatografia/por-que-se-usa-helio-en-cromatografia-de-gases>
- [56] "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," 1999.
- [57] S. Cantera *et al.*, "A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylobacterium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium," *Waste Management*, vol. 102, pp. 773–781, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2019.11.043.
- [58] C. Chen *et al.*, "Fixation of high concentration CO₂ using *Chlorella* – Bacteria symbiosis system," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 83, May 2024, doi: 10.1016/j.jcou.2024.102803.
- [59] S. Cantera, D. Z. Sousa, and I. Sánchez-Andrea, "Enhanced ectoines production by carbon dioxide capture: A step further towards circular economy," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 61, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.jcou.2022.102009.
- [60] M. del R. Rodero *et al.*, "Ectoines production from biogas in pilot bubble column bioreactors and their subsequent extraction via bio-milking," *Water Res*, vol. 245, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.watres.2023.120665.
- [61] J. M. Pastor *et al.*, "Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production," *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 6. pp. 782–801, Nov. 2010. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.06.005.
- [62] S. Cantera, R. Lebrero, L. Sadornil, P. A. García-Encina, and R. Muñoz, "Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement," *J Environ Manage*, vol. 182, pp. 160–165, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.jenvman.2016.07.064.
- [63] L. hua Zhang, Y. jun Lang, and S. Nagata, "Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain," *Extremophiles*, vol. 13, no. 4, pp. 717–724, Jul. 2009, doi: 10.1007/s00792-009-0262-2.



- [64] J. Becker and C. Wittmann, "Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 65. Elsevier Ltd, pp. 118–128, Oct. 01, 2020. doi: 10.1016/j.copbio.2020.02.010.
- [65] S. Cantera, R. Lebrero, E. Rodríguez, P. A. García-Encina, and R. Muñoz, "Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries," *J Clean Prod*, vol. 152, pp. 134–141, May 2017, doi: 10.1016/j.jclepro.2017.03.123.
- [66] Q. Zhao *et al.*, "High ectoine production by an engineered *Halomonas* hydrothermalis Y2 in a reduced salinity medium," *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, Oct. 2019, doi: 10.1186/s12934-019-1230-x.
- [67] M. Liu, H. Liu, M. Shi, M. Jiang, L. Li, and Y. Zheng, "Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals," *Microbial Cell Factories*, vol. 20, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021. doi: 10.1186/s12934-021-01567-6.
- [68] S. Paul, S. K. Bag, S. Das, E. T. Harvill, and C. Dutta, "Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes," *Genome Biol*, vol. 9, no. 4, Apr. 2008, doi: 10.1186/gb-2008-9-4-r70.
- [69] N. M. Belliveau *et al.*, "Fundamental limits on the rate of bacterial growth and their influence on proteomic composition," *Cell Syst*, vol. 12, no. 9, pp. 924–944.e2, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.cels.2021.06.002.
- [70] J. Ye, N. An, H. Chen, Z. Ying, S. Zhang, and J. Zhao, "Performance and mechanism of carbon dioxide fixation by a newly isolated chemoautotrophic strain *Paracoccus denitrificans* PJ-1," *Chemosphere*, vol. 252, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126473.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



7 Anexo 1. Composiciones

7.1 Composición trazas

La composición de las trazas ácidas se muestra en la Tabla 3, mientras que la composición de las trazas básicas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3: Composición de las trazas ácidas

Trazas ácidas	Mg/L
HCl	1823
H ₃ BO ₃	61.8
MnCl ₂	62.9
FeCl ₂	950.6
CaCl ₂	64.9
NiCl ₂	13.0
ZnCl ₂	68.1
CuCl ₂	13.4

Tabla 4: Composición de las trazas básicas

Trazas básicas	Mg/L
NaOH	400
Na ₂ SiO ₃	17.3
Na ₂ WO ₄	29.4
Na ₂ MoO ₄	20.6

7.2 Composición vitaminas

La Tabla 5 indica la composición de la solución de vitaminas utilizada en el proyecto, tras añadir todos los compuestos, se obtuvo una concentración de 100x, demasiado alta para añadirla directamente a las bacterias, por lo tanto, se disolvió con una disolución de carbonato cálcico, la solución 3B, hasta una concentración de 10x, la cual ya se pudo añadir.

Tabla 5: Composición de las vitaminas

Vitaminas	mg por 500 mL
Biotina (Vitamina B7)	10
Nicotinamida (Vitamina B3)	100
Ácido 4-aminobenzoico (Vitamina B10)	50
Tiamina (Vitamina B1)	100



Ácido pantoténico (Vitamina B5)	50
Piridoxamina (Vitamina B6)	250
Cianocobalamina (Vitamina B12)	50
Riboflavina (Vitamina B2)	50

8 Anexo 2: Rectas de calibrado

Para obtener las rectas de calibrado de los gases que relacionasen la concentración de los gases con el área del cromatógrafo. Se partió de una mezcla de gases, de la cual se conocía la composición, en el caso de H₂ y CO₂ se llenó una bolsa de tedlar de 25L a partir de la botella que contenía un 80% de H₂ y un 20% CO₂, mientras que para el O₂ se utilizó una bolsa con O₂ puro, ya que eran las concentraciones máximas que se podían alcanzar en el reactor. A continuación, con la jeringa de gas hermética de 250 µL (Hamilton, USA) se inyectaron diferentes volúmenes (250, 200, 150, 100, 50 µL) al cromatógrafo GC-TCD (Agilent 8860), obteniendo como resultado diferentes áreas. Con la Ecuación 11 se puede conocer la concentración para cada volumen, donde P_i es la presión parcial de cada gas, que es conocida gracias a la Ecuación 12, puesto que los gases se encuentran a presión atmosférica (P_T) y C_i es la concentración volumétrica del compuesto expresada en porcentaje, T es la temperatura de los gases, PM_i es el peso molecular del compuesto y R la constante de los gases. Para finalizar se relacionan las áreas resultantes con las concentraciones obtenidas, obteniendo así la recta de calibrado. Todos los volúmenes se realizan por triplicado para garantizar la veracidad de los resultados.

$$C_i = \frac{P_i * PM_i}{R * T} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$P_i = C_i * P_T \quad \text{Ecuación 12}$$

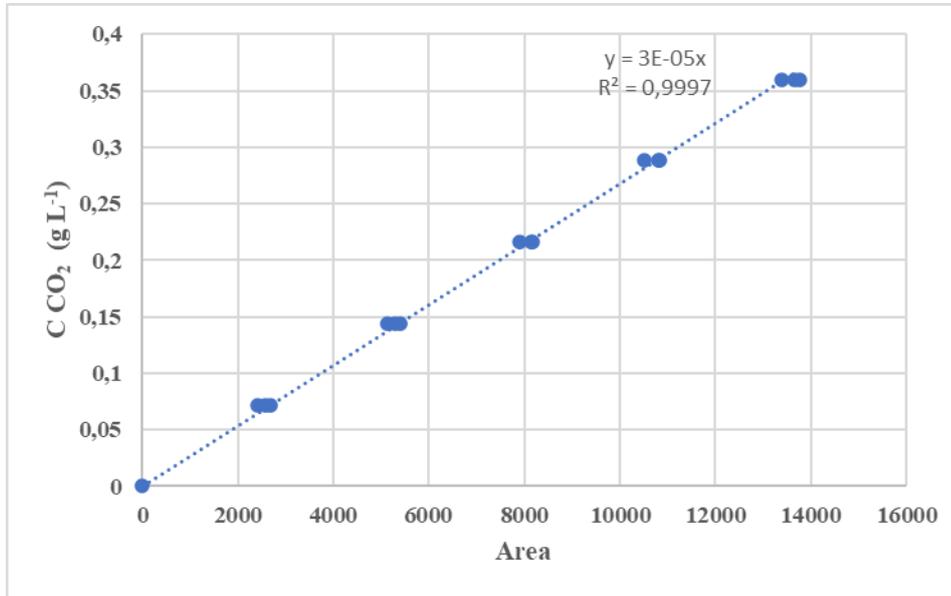


Figura 31: Curva de calibrado del CO₂

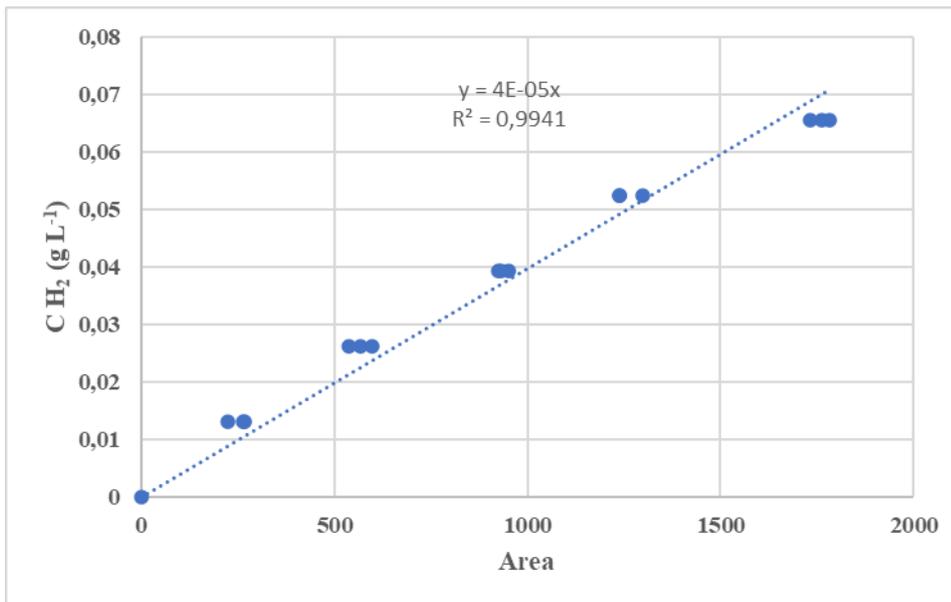


Figura 32: Curva de calibrado del H₂

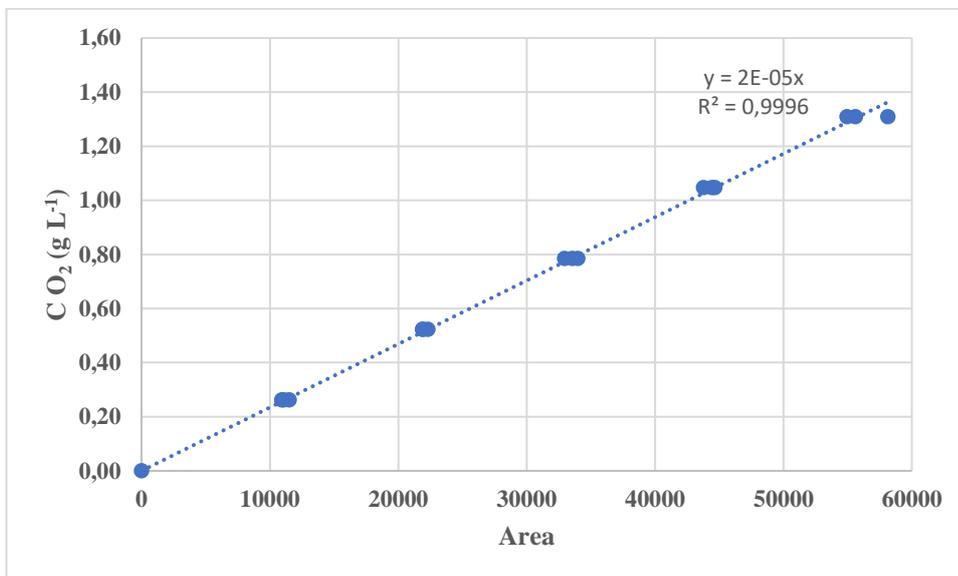


Figura 33: Curva de calibrado del O₂

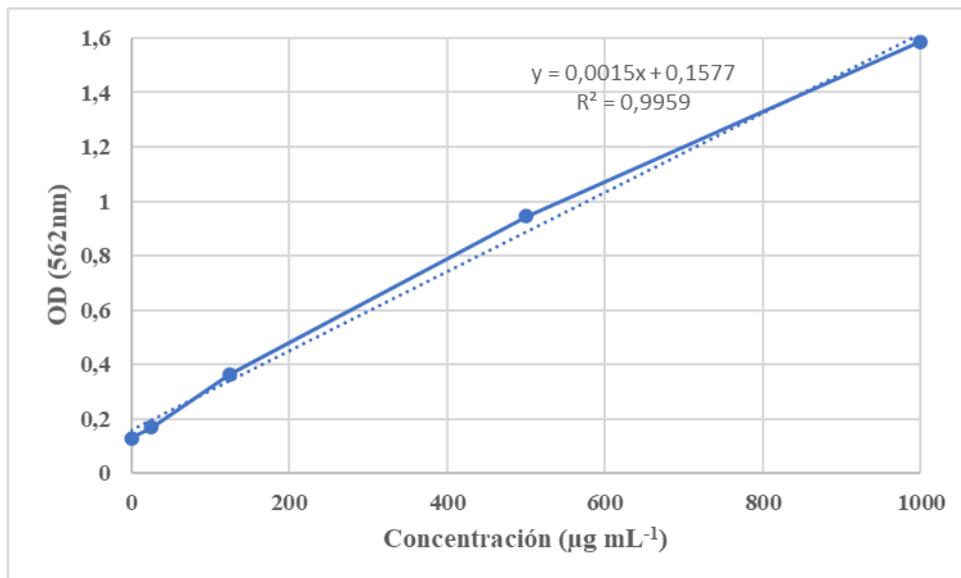


Figura 34: Curva de calibrado de las proteínas

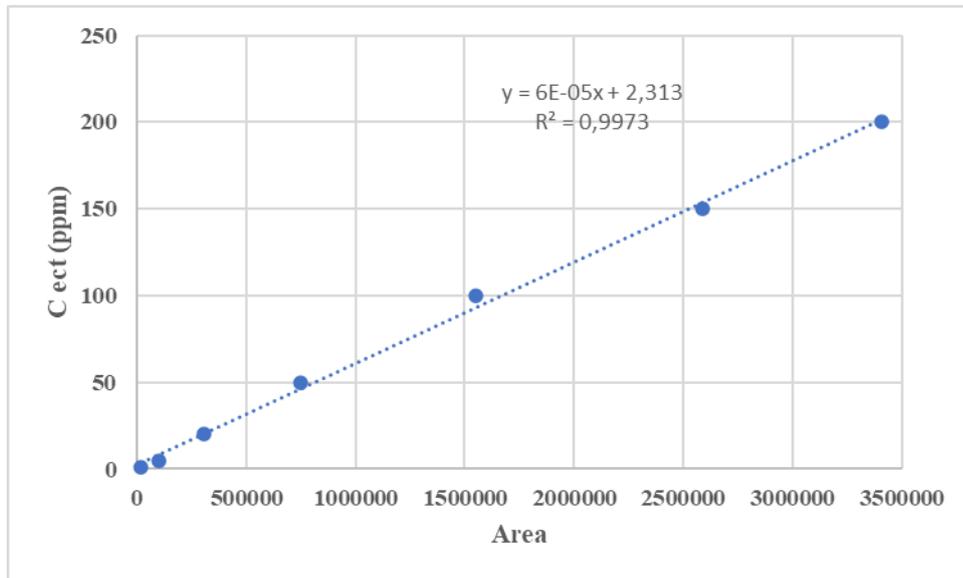


Figura 35: Curva calibrado de la ectoina