



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Análisis y Control de Calidad Químicos.**

**Estudio de un proceso para la extracción y
purificación de ectoína producida por
bacterias metanótrofas a partir de corrientes
gaseosas con metano**

Autor/a: Michael Maroto de Vega

Tutor/es/as: Silvia Bolado Rodríguez

Marta Sánchez Suárez-Otero

Año: 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	5
3. PALABRAS CLAVE	7
4. KEYWORDS	7
5. INTRODUCCIÓN	8
5.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	8
5.2 ECTOÍNA.....	9
5.3 PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA	11
5.4. PURIFICACIÓN DE ECTOÍNA	14
5.5 PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ECTOÍNA	15
6. OBJETIVOS	16
7. TRABAJO EXPERIMENTAL	17
7.1. BIO-MILKING.....	17
7.2. ELECTRODIÁLISIS	17
7.3. INTERCAMBIO IÓNICO	18
7.4. PRECIPITACIÓN CON METANOL	19
7.5. ESTUDIO DE UNA SEGUNDA ELECTRODIÁLISIS	19
7.6. CRISTALIZACIÓN	20
7.7. MATERIALES	21
7.9. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	23
8. RESULTADOS EXPERIMENTALES	25
8.1. BIO-MILKING.....	25
8.2. ELECTRODIÁLISIS	26
8.3. INTERCAMBIO IÓNICO	28
8.4. PRECIPITACIÓN CON METANOL	30
11.5. SEGUNDA ELECTRODIÁLISIS	31
11.6. CRISTALIZACIÓN	31
12. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS	33
13. BIBLIOGRAFÍA	34
14. ANEXO	37

1. RESUMEN

En este trabajo se ha realizado el estudio de diferentes alternativas del proceso de obtención y purificación de ectoína a partir de bacterias metanótrofas crecidas en medios altamente salinos, alimentadas con residuos en plantas de tratamiento de gases, partiendo de estudios previos de laboratorio y referencias bibliográficas.

El proceso consta de dos etapas principales: una primera en la que se extrae la ectoína de las bacterias mediante un proceso conocido como bio-milking y un proceso de purificación de ectoína en el que se ha estudiado el uso de diferentes ácidos, con el objetivo de separar la ectoína del resto de sólidos (ST) presentes en la disolución obtenida tras el bio-milking.

La extracción de la ectoína presente en las células cultivadas en una disolución fuertemente salina en la etapa de bio-milking se realiza con un choque hipo-osmótico con agua destilada y un centrifugado. Se han probado diferentes relaciones agua/biomasa y distintos tiempos de agitación con el objetivo de optimizar el proceso, obteniendo los mejores resultados para una relación agua /biomasa 1:4 y un tiempo de agitación de 5 minutos, con un rendimiento de extracción de ectoína en esta etapa del 24 %.

El proceso de purificación consta en primer lugar de una electrodiálisis que elimina las sales de nuestra disolución. En los dos experimentos realizados, con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, se obtuvo en esta etapa una recuperación de ectoína del 66 %, con una eliminación de sales (objetivo de esta parte del experimento) del 98 % en ambos casos.

A continuación, la disolución desalinizada se procesa en una columna de intercambio iónico con una resina que, en medio ácido (pH 2), retiene la ectoína que es recuperada posteriormente empleando como eluyente una disolución de NaOH 1.3M. Este trabajo evalúa el empleo de dos ácidos diferentes: ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. Una vez recuperada la ectoína, la muestra se neutraliza con uno u otro ácido, según el experimento. Para el ácido sulfúrico se obtuvo en una recuperación de ectoína del 70 % con ácido sulfúrico respecto de la etapa anterior, y del 66 % en el caso del ácido clorhídrico. Si bien debido al uso de los diferentes ácidos y bases, la concentración de sales aumenta significativamente en esta etapa en ambos experimentos, el objetivo era eliminar sólidos volátiles (SV) diferentes de la ectoína que no se consiguió, disminuyendo la relación ectoína/SV en esta etapa, en contra de lo esperado.

Cuando se usa ácido sulfúrico, el siguiente paso es una precipitación de los sulfatos con metanol. En el experimento con ácido clorhídrico, la muestra neutralizada se trata mediante una segunda electrodiálisis. En la precipitación con metanol se obtuvo una recuperación de ectoína del 53 %, mientras que en la segunda electrodiálisis se obtuvo un 92 % de recuperación de ectoína. El objetivo de la precipitación y de la segunda electrodiálisis era la reducción de las sales presentes, con una reducción del 99.8 % en la precipitación con metanol y del 99 % en la segunda electrodiálisis. De forma global, en el experimento con ácido sulfúrico se ha conseguido una reducción de sales del 99.5 % y con ácido clorhídrico del 99.8 %. Aunque este no era, en principio el objetivo de esta

etapa, se redujeron también un 93 % los SV en la precipitación con metanol y un 95 % en la segunda electrodiálisis. Se logró así una reducción global de los SV en todo el proceso del 96 % con ácido sulfúrico y del 90 % con ácido clorhídrico.

Finalmente, en ambos casos, la disolución final se cristaliza en un evaporador para obtener el producto final, con un porcentaje de recuperación final de ectoína del 24.3 % con ácido sulfúrico y 38 % con ácido clorhídrico. En el proceso global la pureza aumentó de un porcentaje ectoína/ST inicial de 0.8 % hasta un porcentaje ectoína/ST de 28.3 % con ácido sulfúrico y 39 % con ácido clorhídrico.

2. ABSTRACT

In this work, a study was conducted on different alternatives for the process of obtaining and purifying ectoine from methanotrophic bacteria grown in highly saline media, fed with waste from gas treatment plants, based on previous laboratory studies and bibliographic references.

The process consists of two main stages: the first one involves extracting ectoine from the bacteria through a process known as bio-milking, and a purification process in which the use of different acids was studied with the aim of separating ectoine from the rest of the solids (ST) present in the solution obtained after bio-milking.

The extraction of ectoine present in the cells cultivated in a highly saline solution during the bio-milking stage is performed with a hypo-osmotic shock using distilled water and centrifugation. Different water/biomass ratios and various agitation times were tested to optimize the process, achieving the best results with a water/biomass ratio of 1:4 and an agitation time of 5 minutes, resulting in an ectoine extraction yield of 24% in this stage.

The purification process first involves electro dialysis, which removes salts from our solution. In the two experiments conducted with sulfuric acid and hydrochloric acid, an ectoine recovery of 66% was achieved in this stage, with a salt removal (the goal of this part of the experiment) of 98% in both cases.

Next, the desalinated solution is processed in an ion exchange column with a resin that, in an acidic medium (pH 2), retains the ectoine, which is later recovered using a 1.3M NaOH solution as an eluent. This work evaluates the use of two different acids: sulfuric acid and hydrochloric acid. Once the ectoine is recovered, the sample is neutralized with either acid, depending on the experiment. For sulfuric acid, an ectoine recovery of 70% from the previous stage was obtained, and 66% in the case of hydrochloric acid. However, due to the use of different acids and bases, the salt concentration increases significantly in this stage in both experiments. The goal was to eliminate volatile solids (VS) different from ectoine, which was not achieved, decreasing the ectoine/Vs ratio in this stage, contrary to expectations.

When sulfuric acid is used, the next step is sulfate precipitation with methanol. In the experiment with hydrochloric acid, the neutralized sample is treated through a second electro dialysis. In the methanol precipitation, an ectoine recovery of 53% was obtained, while the second electro dialysis yielded a 92% ectoine recovery. The objective of the

precipitation and the second electro dialysis was the reduction of the present salts, with a reduction of 99.8% in the methanol precipitation and 99% in the second electro dialysis. Overall, the experiment with sulfuric acid achieved a salt reduction of 99.5%, and with hydrochloric acid, 99.8%. Although this was not initially the goal of this stage, the VS were also reduced by 93% in the methanol precipitation and 95% in the second electro dialysis. Thus, a global reduction of VS in the entire process of 96% with sulfuric acid and 90% with hydrochloric acid was achieved.

Finally, in both cases, the final solution is crystallized in an evaporator to obtain the final product, with a final ectoine recovery percentage of 24.3% with sulfuric acid and 38% with hydrochloric acid. In the overall process, the purity increased from an initial ectoine/ST percentage of 0.8% to an ectoine/ST percentage of 28.3% with sulfuric acid and 39% with hydrochloric acid.

3. PALABRAS CLAVE

Ectoína, bio-milking, electrodiálisis, intercambio iónico, precipitación, cristalización, evaporación.

4. KEYWORDS

Ectoine, bio-milking, electro dialysis, ion exchange, precipitation, crystallization, evaporation.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

En las últimas décadas, las excesivas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), debido principalmente a la quema de combustibles fósiles para la generación de energía, ha contribuido significativamente al aumento de la temperatura de la Tierra y, por tanto, al calentamiento global (Jeffrey et al., 2021). Entre los GEI destacan el dióxido de carbono (CO₂) y el metano (CH₄), cuya concentración en la atmósfera ha aumentado en los últimos años en un 30 y un 70%, respectivamente (Bačėninaitė et al., 2022).

El metano representa el 20% del total del GEI con una capacidad para contribuir al calentamiento global 25 veces superior a la del CO₂, cuya presencia en la atmósfera aumenta anualmente entre un 0.2 y un 1%, principalmente debido a actividades humanas (60%) y fuentes naturales (40%) (UNEP, 2021; Mundra and Lockley, 2024).

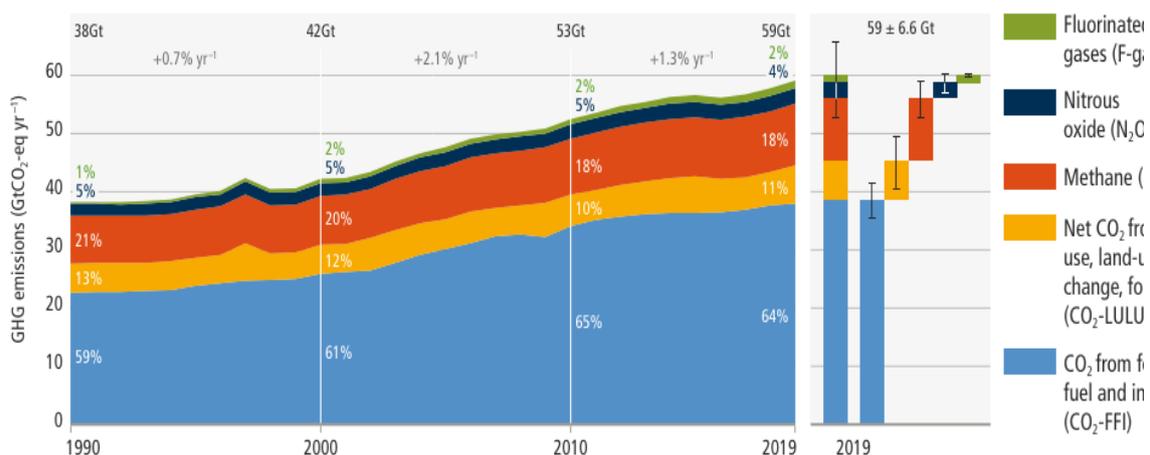


Ilustración 1. Emisiones globales anuales de la GEI antropogénico entre 1990 y 2020. Fuente: Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC 2023).

El metano se genera en procesos de digestión anaerobia, y su presencia en la atmósfera ha llegado a ser hasta un 150% más elevada que en la era preindustrial. Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), la agricultura es la principal fuente antropogénica de metano (40%) incluyendo la ganadería y el cultivo de arroz, seguido por las emisiones generadas en el sector de los combustibles fósiles (35%) y la descomposición de materia orgánica (residuos alimentarios) y corrientes de aguas residuales (20%) (Jackson et al. 2020).

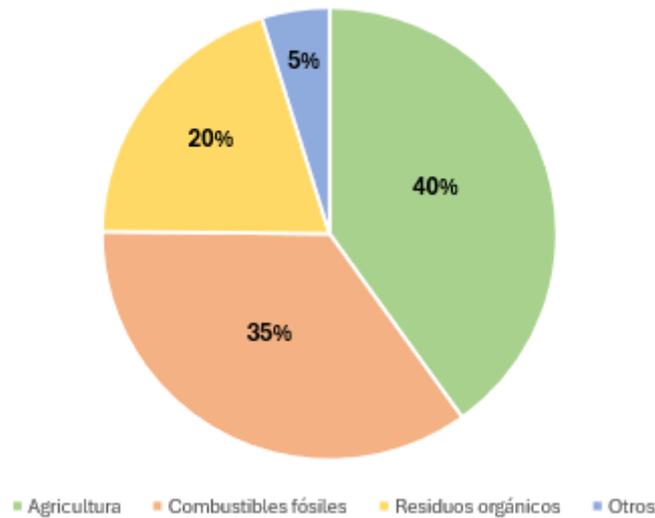


Ilustración 2. Fuentes antropogénicas de emisión de metano. Adaptado de Mundra and Lockley (2024).

En los últimos años ha aumentado el interés del metano como combustible en la generación de energía para lo que se requieren concentraciones superiores al 30% en volumen en las emisiones gaseosas. Estas condiciones se encuentran principalmente en entornos específicos como grandes vertederos o plantas de tratamiento de aguas residuales (Cantera et al., 2018; Estrada et al., 2014). Concentraciones de metano inferiores se consideran residuos que requieren tratamiento y aprovechamiento.

La continua emisión de metano debido a la actividad humana ha alcanzado niveles muy por encima del umbral de la capacidad de eliminación de este gas en sumideros naturales. Por ello, en los últimos años ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitan reducir los altos niveles de metano atmosférico (Ngoc et al., 2023).

Los miembros de las Naciones Unidas, a través del Pacto de Paris en la Convención de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, se han comprometido a reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) con el objetivo de limitar el aumento de la temperatura media global a 2°C por encima de los niveles preindustriales, lo que resalta la importancia de reducir la liberación de estos gases a la atmósfera (Jeffry et al. 2021). En este contexto, la bioconversión de metano presente en bajas concentraciones en gases residuales en productos de alto valor añadido como la ectoína puede ser una interesante alternativa para el control de las emisiones de metano, convirtiendo la reducción de GEI en un proceso sostenible y rentable (Cantera et al., 2017).

5.2 ECTOÍNA

La ectoína es un compuesto cíclico derivado del aspartato, también conocido como (ácido 2-metil-3,4,5,6-tetra-4-pirimidinocarboxílico). Debido a sus características estructurales, la ectoína presenta una gran capacidad para unirse al agua, lo que permite equilibrar la presión osmótica dentro y fuera de las células (Dubencovs et al., 2022). Además, este compuesto puede ayudar a estabilizar la estructura de enzimas y macromoléculas, así

como influir en el plegamiento y la agregación de proteínas y péptidos, protegiendo la piel del daño oxidativo y envejecimiento (Feng et al., 2024). Investigaciones han revelado que la ectoína puede inhibir la agregación y neurotoxicidad de péptidos asociados con enfermedades priónicas, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, causadas por acumulación de proteínas mal plegadas llamadas priones. Estas proteínas pueden inducir a otras proteínas normales a plegarse incorrectamente, lo que lleva a la formación de agregados tóxicos y neurodegeneración (Girigoswami et al., 2023).

La ectoína estabiliza las proteínas nativas y previene su desnaturalización y agregación bajo condiciones de estrés. Al interactuar con las proteínas, la ectoína puede impedir que adopten conformaciones mal plegadas evitando así la formación de agregados priónicos, lo que reduce la neurotoxicidad asociada a estas formaciones y evita la muerte celular inducida por estrés proteotóxico (Reshetnikov et al. 2020).

La ectoína es un osmólito compatible, lo que significa que puede equilibrar el estrés osmótico en las células sin interferir con la función celular normal. Esto contribuye a la estabilidad y función de las proteínas y las membranas celulares (Czech, et al., 2018).

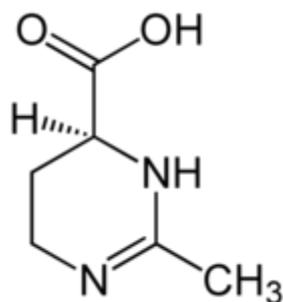


Ilustración 3. Estructura química de la ectoína. (Ectoína-Wikipedia, La Enciclopedia Libre).

Este compuesto, que actúa como extremolito y osmoprotector, fue identificado por primera vez en la bacteria metanótrofa *Halorhodospira halochloris*, y es el componente más relevante de aquellos derivados del metano (Carmona-Martínez et al., 2021).

Las bacterias que habitan en entornos con altas concentraciones salinas han desarrollado la capacidad de producir compuestos como la ectoína que les ayudan a sobrevivir al estrés osmótico, así como a otros desafíos ambientales como cambios de temperatura, desecación, radiación y agentes desnaturalizantes (Li et al., 2024).

La ectoína es producida por un amplio rango de bacterias halófilas y halotolerantes ante situaciones de estrés, manteniendo un equilibrio osmótico sin afectar sus funciones vitales ni su metabolismo celular. En concreto, la producción comercial de ectoína es llevada a cabo normalmente por bacterias del género *Halomonas* como *Halomonas elongata* que produce ectoína como el principal soluto compatible (Orhan et al., 2023).

Uno de los mecanismos protectores de la ectoína es la formación de una capa de hidratación alrededor de macromoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos, lo que

contribuye a mantener su estructura y funcionalidad. La ectoína, gracias a sus propiedades osmoprotectoras, es un compuesto con interesantes aplicaciones en el sector cosmético, médico y farmacéutico cuyo valor de mercado se estima entre 600 y 1000 €/kg (Cantera et al., 2018).

En términos comerciales, la ectoína se emplea normalmente como ingrediente en la formulación de compuestos cosméticos protegiendo las células de la piel contra alérgenos, calor, sequedad y radiación UV. En cosmética, la ectoína mejora la hidratación de la piel y fortalece su barrera protectora sin causar alergias ni irritaciones. También se utiliza en el sector farmacéutico en productos de inhalación y sprays nasales (Patel et al., 2021).

En el ámbito médico, se ha reportado el uso de ectoína en terapias anti-amiloides para tratar enfermedades como el Alzheimer, al inhibir la formación de amiloide A β 42, un péptido directamente relacionado con esta enfermedad, y reducir la toxicidad de las células del neuroblastoma humano. Además, se ha demostrado que la administración de ectoína puede inhibir la actividad de nanopartículas que desencadenan reacciones inflamatorias en las células epiteliales pulmonares (Bethlehem and Echten-Deckert, 2021).

5.3 PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA

Como se ha comentado previamente, dada la relevancia del metano como GEI y las diversas aplicaciones de la ectoína, una de las principales alternativas para aprovechar bajas concentraciones de este gas es utilizarlo como fuente de alimentación para bacterias capaces de producir ectoína.

En la actualidad, la ectoína se produce a escala industrial a partir de cultivos de la bacteria metanótrofa *Halomonas elongata*, que puede ser reutilizada hasta nueve veces por cultivo para la producción de ectoína debido a su alta tolerancia a la sal y eficacia en la síntesis del compuesto.

Esta bacteria que se encuentra en entornos salinos es conocida por su capacidad para sintetizar ectoína como un mecanismo de adaptación al estrés osmótico.

Para ello, el primer paso de la ruta metabólica consiste en una conversión de ácido aspártico en ácido diaminobutírico, catalizado por la enzima L-aspartado- β -semialdehído deshidrogenasa. A continuación, el ácido diaminobutírico se transforma en N- γ -acetil-L-2,4-diaminobutírico en una reacción catalizada por la enzima ácido diaminobutírico aminotransferasa. Por último, el compuesto se cicla gracias a la enzima ectoína sintasa para formar la ectoína.

En ambientes con altas concentraciones de sal se induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ectoína, lo que lleva a la producción de ectoína

intracelular cuyos niveles aumentan de forma proporcional a la concentración de sal en el medio (Czech et al., 2018). Además, se han reportado en la bibliografía estudios recientes que exploran la posibilidad de usar cultivos de *M. alcaliphilum* 20Z con este objetivo (Yao et al., 2023).

Algunos estudios sugieren que las poblaciones bacterianas compuestas por múltiples especies son más robustas y producen más ectoína que las poblaciones de un solo tipo de bacteria. Además, factores como el pH, la temperatura, los nutrientes y la salinidad del medio afectan la producción de ectoína, al igual que la presencia de tungsteno, que evita la acumulación de ácido fórmico, un inhibidor de la producción de ectoína (Oren, 2013).

Para suministrar metano a las bacterias, es necesario tratar el gas mediante una desulfuración previa para eliminar el sulfuro de hidrógeno (H₂S), evitando daños en el biorreactor y el equipo de purificación. Se ha determinado que el método más eficaz para este proceso es el uso de un filtro anóxico de biotrickling, consiguiéndose una mayor eficacia de eliminación (Pérez et al., 2021). La concentración de ectoína obtenida se sitúa entre 12-16 mg/100 mg de biomasa utilizando un medio con una concentración de sal del 6% NaCl, lo que equivale a una producción de 1-3 g de biomasa por litro de medio.

El proceso de obtención de la ectoína, denominado biomilking, se basa en una fermentación long-fed batch con variaciones en las concentraciones de NaCl. El biomilking es un proceso biotecnológico diseñado para maximizar la producción de compuestos bioactivos, como la ectoína, en cultivos bacterianos. El proceso consta de 3 etapas:

1. Fermentación Long-Fed Batch, que es una variante de la fermentación en lotes en la que se añade continuamente el medio de cultivo fresco durante un período prolongado. Esto permite mantener el cultivo bacteriano en un estado productivo por más tiempo, optimizando la producción de ectoína.
2. Variaciones en las concentraciones de NaCl: La fermentación comienza con una determinada concentración inicial de NaCl en el medio de cultivo. Las bacterias comienzan a crecer y a producir ectoína en respuesta al estrés osmótico inducido por la sal. Durante el proceso, la concentración de NaCl se incrementa gradualmente. Este aumento continuo de la salinidad fuerza a las bacterias a producir más ectoína para equilibrar el estrés osmótico. Mantener un equilibrio adecuado de nutrientes y salinidad es un factor clave para asegurar la viabilidad y productividad de las bacterias durante el proceso.
3. Extracción de ectoína: Una vez que se ha alcanzado la concentración deseada de ectoína, las células bacterianas se lisan para liberar el compuesto; A continuación, la ectoína se separa del resto de medio de cultivo y se purifica mediante diferentes operaciones de separación para obtener el producto final de alta pureza (Zhang et al., 2022).

En la Universidad de Valladolid, en el Instituto de Procesos Sostenibles, se están llevando a cabo estudios sobre la producción de ectoína a partir de gases residuales de metano. Se utilizan diversos tipos de reactores, incluido un reactor aislado de columna de burbujeo y una instalación con dos biorreactores interconectados. Se han obtenido resultados prometedores mediante un proceso de bio-milking, que incluye una centrifugación inicial del cultivo, seguida de la mezcla con agua destilada para liberar la ectoína, y una centrifugación adicional para separar la biomasa del sobrenadante que contiene la ectoína. Con este proceso se han obtenido 87 mg de ectoína por gramo de sólidos volátiles suspendidos (VSS) en el biorreactor con un 6% de NaCl y 1246 mg de ectoína por gramo de VSS en el biorreactor con un 0% de NaCl.



Ilustración 4. Reactor de Flujo de Taylor para la producción de ectoína empleado en el laboratorio del Instituto en Procesos Sostenibles (Universidad de Valladolid).

5.4. PURIFICACIÓN DE ECTOÍNA

La purificación de la ectoína es una etapa crucial en su producción comercial, especialmente para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas que requieren altos niveles de pureza. En este contexto, se están investigando diferentes alternativas que permitan procesos viables de purificación tanto desde un punto de vista técnico como económico. De acuerdo con la bibliografía, uno de los métodos de concentración y purificación de ectoína más prometedores en términos de escalabilidad y rentabilidad se basa en el empleo de una cromatografía de intercambio iónico seguida de una cristalización con metanol (Pérez et al., 2022). De forma más concreta, el proceso consta de varias etapas:

- Tras el bio-milking, se lleva a cabo una electrodiálisis para desalinizar la solución que contiene ectoína.
- Como paso previo a la columna de intercambio iónico, la corriente líquida resultante de la electrodiálisis se acidifica hasta pH 2 con el objetivo de ionizar la muestra.
- El caldo sin sales, pero conteniendo aún diferentes metabolitos, se procesa en un equipo de columna de intercambio iónico para la adsorción de la ectoína que se eluye con una disolución de NaOH. Esta es una etapa clave en el proceso de purificación de ectoína por lo que la selección de resinas altamente activas, selectivas y compactas es un factor determinante que influye en la cantidad y calidad del producto final.
- La disolución alcalina que contiene la ectoína se neutraliza con H_2SO_4 y se seca por evaporación hasta obtener una concentración del 95% en sólidos.
- Tras esto, la ectoína concentrada se purifica mediante cristalización con metanol, donde el metanol precipita el sulfato de sodio formado durante la neutralización.
- Finalmente, tras un filtrado se recupera la solución con ectoína y metanol y se lleva a cabo una cristalización evaporativa para obtener el producto final.

Para recuperar el 90% del metanol utilizado, se somete la disolución a un ciclo de evaporación-condensación con vapor a baja presión y agua de refrigeración.

Además de este método, existen otras alternativas en investigación, como la purificación mediante métodos cromatográficos o la extracción con sistemas acuosos bifásicos (ABS). Los ABS emplean dos fases líquidas inmiscibles para recuperar biomateriales, ofreciendo un entorno biocompatible para el procesamiento de las biomoléculas. Aunque esta técnica está en desarrollo, muestra potencial para una purificación eficiente de la ectoína (Ng et al., 2023).

5.5 PROCESOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ECTOÍNA

Este trabajo forma parte de dos proyectos europeos en curso en los que el Instituto de Procesos Sostenibles de la Universidad de Valladolid:

CHEERS:

En colaboración con varias empresas europeas, entre las que destacan Mahou y Aqualia de España, así como Symrise AG (Alemania), Conservation Education and Research Trust (Reino Unido) y Entogourmet (Países Bajos), el proyecto CHEERS tiene como objetivo valorizar residuos de la industria alimentaria y de bebidas. En particular, en este proyecto se plantean alternativas de valorización de residuos generados en la industria cervecera como el bagazo de cerveza, aguas residuales, CO₂ y CH₄ con el objetivo de obtener productos de alto valor añadido (proteínas de insectos, ácido caproico, hipoclorito y ectoína), competitivos e innovadores de aplicación en diferentes sectores.

La Universidad de Valladolid (UVa) llevará a cabo el diseño de un reactor de flujo Taylor a escala de laboratorio cuya tecnología mejorará el transporte de masa de gas-microorganismo del metano. Además, la UVa, en colaboración con Genia Bioenergy, llevará a cabo el diseño y escalado a nivel industrial del proceso de biomilking y purificación de ectoína.

DEEP PURPLE:

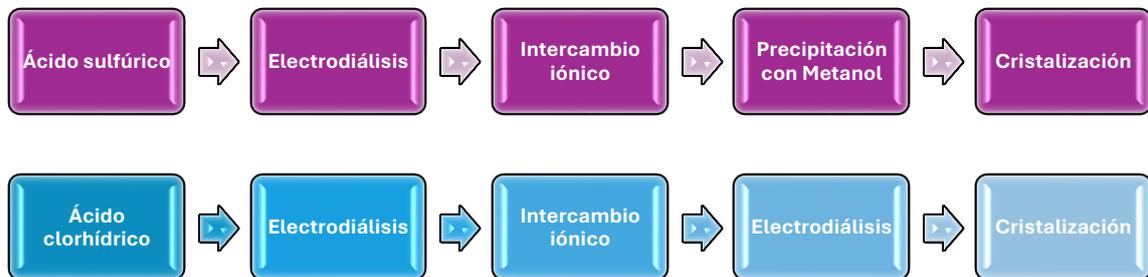
Este proyecto, coordinado por Aqualia, se centra en el tratamiento integrado de tres tipos de residuos: la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos, los lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales y las aguas residuales urbanas. Utilizando una fotobiorrefinería multiplataforma basada en bacterias púrpuras fototróficas, DEEP PURPLE tiene como objetivo generar cinco nuevos bioproductos (fertilizantes, PHAs, celulosa, nanofibras de celulosa y ectoína) con aplicaciones comerciales en varios sectores. En este proyecto, la UVa llevará a cabo un estudio de la bioconversión de metano en ectoína utilizando biorreactores de alta transferencia de masa. Además, trabajará en la optimización de las diferentes etapas del proceso de purificación de ectoína a escala de laboratorio.

Estos proyectos representan esfuerzos innovadores para transformar residuos en recursos valiosos y reducir el impacto ambiental de las industrias alimentaria y de tratamiento de aguas residuales. La participación de la UVa en la obtención y purificación de ectoína demuestra su compromiso con la investigación y el desarrollo sostenible.

6. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del efecto de diferentes variables de operación en las etapas críticas del proceso de extracción y purificación de ectoína producida por bacterias metanótrofas a partir de gases residuales de la industria cervecera con baja composición en hidrógeno y metano. Con este fin, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudio del efecto de diferentes parámetros (relación agua/biomasa, tiempo de agitación) en el bio-milking para maximizar la extracción de ectoína.
- Realización de una electrodiálisis y una columna de intercambio iónico en la purificación de ectoína.
- Evaluación del uso de diferentes ácidos (HCl y H₂SO₄) en la etapa de intercambio iónico.
- Comparación de los procesos posteriores de purificación de ectoína para cada uno de los ácidos evaluados en el intercambio iónico.



7. TRABAJO EXPERIMENTAL

7.1. BIO-MILKING

En primer lugar, se estudiaron diferentes variables de operación en la etapa de bio-milking, en concreto relación agua/biomasa y tiempo de agitación, utilizando volúmenes pequeños de bio-milking para aumentar la concentración inicial de ectoína y reducir los costes de la purificación. Trabajar con disoluciones iniciales concentradas aumenta además los rendimientos de recuperación y de eliminación de impurezas.

Una vez obtenida la biomasa del reactor, se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm y se descartó el sobrenadante. El objetivo de este paso es la recuperación de la biomasa, así como la eliminación de la mayor cantidad de disolución salina que acompaña a la biomasa. A continuación, el pellet se resuspendió en agua en diferentes relaciones agua/biomasa: 1:4; 1.5:4 y 2:4 y se agitó con un agitador Lbx instruments H03D series a diferentes tiempos (0,5, 15 y 30 minutos) para determinar las mejores condiciones de bio-milking y optimizar así la extracción de ectoína. Para llevar a cabo este estudio se analizó la concentración de ectoína en mg/L.

7.2. ELECTRODIÁLISIS

La electrodiálisis es un proceso que consiste en la separación de iones en solución mediante el uso de una corriente eléctrica a través de membranas selectivamente permeables. Se utiliza principalmente para desalinizar o desmineralizar agua, pero tiene también aplicaciones en el campo del tratamiento de aguas residuales o en la producción de productos químicos.

En este proceso se utilizan dos tipos de membranas; una permite el paso de cationes y otra el paso de aniones que se disponen de forma alterna entre los dos electrodos formando una serie de celdas que se llenan con la solución a tratar.

Mediante la aplicación de una corriente eléctrica los cationes se desplazan hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo.

Cuando se aplica la corriente eléctrica, los iones disueltos en la solución son atraídos por sus respectivos electrodos y pasan a través de las membranas ion-selectivas. Este proceso da lugar a dos corrientes de solución: una con menor concentración de iones (agua desmineralizada) y otra con mayor concentración de iones (solución concentrada).

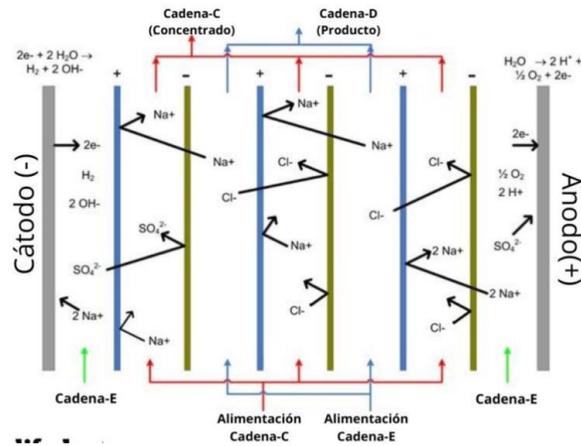


Ilustración 5. Funcionamiento esquemático de la electrodiálisis

Para estudiar el funcionamiento de la electrodiálisis se realizan varios experimentos con muestras de 500 mL y corrientes de 11.5 V.

Este proceso se llevó a cabo utilizando un equipo de electrodiálisis al que se conectaron tres corrientes diferentes con un volumen de 500 mL cada una: la muestra para desalinizar, agua destilada que servirá para concentrar las sales eliminadas de la muestra y una disolución polar de NaCl al 3%.

La conductividad de la muestra se midió de forma continua durante todo el proceso, ya que a medida que disminuya la concentración de NaCl disminuirá la conductividad, pudiendo seguir así el avance del proceso. En este apartado también se analizaron ST, SV, pH y concentración de ectoína.

7.3. INTERCAMBIO IÓNICO

En este trabajo se estudiaron 2 alternativas, diferenciadas por el ácido empleado en esta etapa del proceso: HCl o H₂SO₄. Estudios preliminares han mostrado buenos rendimientos de recuperación de ectoína trabajando con H₂SO₄, tanto para la acidificación de la disolución como para la regeneración de la resina. Sin embargo, la eliminación de los sulfatos generados requiere una etapa de concentración por evaporación, cristalización drowning-out por adición de alcoholes u una nueva evaporación. Como alternativa, el empleo de HCl podría ser menos efectivo en la regeneración y limpieza de la columna de intercambio iónico, pero simplificaría la posterior purificación, pudiendo realizar una segunda electrodiálisis para eliminar el NaCl y una evaporación.

A continuación, con la ayuda de una bomba peristáltica, se pasa la disolución ácida con ectoína a través de la columna con un diámetro de 3 cm y una altura de 21 cm con una velocidad de 0.030 cm/s con el objetivo de separarla de otros compuestos orgánicos presentes en el caldo. Una vez adsorbida la ectoína en la resina, se recupera utilizando

como eluyente una disolución de NaOH 1.3 M con un volumen de 1.0 L y una velocidad de paso de 0.030 cm/s. El eluido se recuperó en 4 fracciones correspondientes a un volumen de columna cada una (250 mL). En cada una de estas fracciones se analizó el contenido en ST, SV, concentración de ectoína, pH y conductividad.

Las fracciones eluidas que contenían ectoína se neutralizaron empleando ácido sulfúrico al 96 % (v/v) o HCl al 37 % (w/w) en función del experimento hasta un pH de 7.

Una vez recuperada la ectoína, se llevó a cabo la regeneración de la resina de intercambio iónico con 0.5 L de H₂SO₄ 0.5 M o HCl en la misma concentración, dependiendo del ácido utilizado previamente para acidificar la disolución, con el objetivo de volver a ionizarla y se lavó con agua (0.5 L) para eliminar los residuos. Regeneración y lavado se realizaron con flujos de 0.020 L/h.

La bibliografía (Pérez et al., 2022) propone la regeneración de la columna con ácido sulfúrico concentrado (98 % w/w) y a continuación un lavado con agua destilada. Sin embargo, el uso de este ácido en estas concentraciones y elevados volúmenes presentan riesgos elevados para la seguridad y un impacto ambiental importante. Por ello, en este trabajo se estudió el empleo de una disolución de ácido sulfúrico o de ácido clorhídrico 0.5 M como regenerante en función de cada experimento.

7.4. PRECIPITACIÓN CON METANOL

En los experimentos en los que se empleó H₂SO₄ se realizó una etapa de precipitación de los sulfatos presentes en la disolución eluida y neutralizada, mediante adición de metanol. Para ello, es necesario previamente concentrar la disolución eluida eliminando agua hasta alcanzar una humedad de solo 5 % de agua. Con este objetivo, se utilizó un rotavapor con una bomba de vacío con una temperatura de 70 °C y una bomba de presión que trabaje a 0.3 bar para evaporar el agua hasta alcanzar un 95 % en masa de ectoína y poder trabajar con volúmenes menores de metanol reduciendo los costes del proceso.

A continuación, se añadió metanol a la disolución concentrada (120 mL) formándose un precipitado de Na₂SO₄ que se filtró utilizando una bomba de vacío y se recuperó el sobrenadante que contenía una solución de metanol y ectoína ya libre de sales.

Se analizó el contenido en ectoína, ST y SV de este sobrenadante.

7.5. ESTUDIO DE UNA SEGUNDA ELECTRODIÁLISIS

En el experimento realizado empleando HCl para acidificar y regenerar la columna de intercambio iónico, se realizó una nueva electrodiálisis para eliminar las sales presentes en la disolución de ectoína eluida y neutralizada. Al igual que en la primera etapa de electrodiálisis, se utilizó un equipo de electrodiálisis, nuestra muestra, una disolución

donde se concentrará toda la sal eliminada de la muestra y una disolución de NaCl al 3 % como disolución polar, todas ellas en volúmenes de 0.5 L.

Se siguió la evolución de la conductividad durante todo el proceso como indicativo de la eliminación de sales. Además, en las diferentes corrientes obtenidas se analizó de nuevo el contenido en ST, SV y ectoína.

7.6. CRISTALIZACIÓN

Como última etapa, para obtener el producto final, ectoína sólida, se evaporó el disolvente de la disolución de ectoína en metanol en el proceso con H_2SO_4 y en agua cuando se usó HCl. Se empleó un rotavapor a una temperatura de 50 °C y 0.56 bar con una bomba de vacío que nos ayuda a reducir la temperatura de ebullición de nuestro disolvente. Se determinó la masa y el contenido en ectoína, ST y SV del producto final.

7.7. MATERIALES

Se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- Un caldo de cultivo de bacterias metanótrofas proporcionado por el proyecto DEEP PURPLE,
- Agua destilada.
- NaCl de 99 % de pureza de Panreac AppliChem.
- 0.05 kg de una resina comercial de intercambio iónico DOWEX 50x X8.
- Ácido sulfúrico al 96 % (v/v)
- Ácido clorhídrico al 37 % (w/w).
- Metanol al 99 % extra puro Thermo Scientific Chemicals.
- Una Centrífuga Sorvall ST 16.d serie.
- Un Agitador Lbx Instruments H03
- Un pH-metro Crison GLP 22 para controlar el pH en cada paso.
- Una columna con un diámetro de 3 cm y una altura de 21 cm cargada con la resina de intercambio iónico mencionada y un volumen de lecho de 0.25 L.

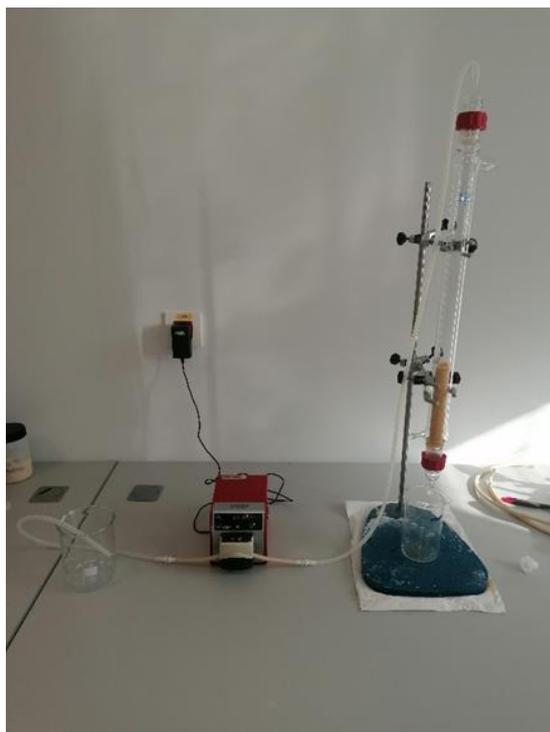


Ilustración 6. Montaje de la columna de intercambio iónico

- Una bomba peristáltica para impulsar la disolución a través de la membrana, así como tubos que conectan la muestra con el equipo.
- Un equipo de electrodiálisis de la marca Gouchu Technology GCM-E-10.



Ilustración 7. Equipo de electrodiálisis

- Un conductímetro Conductimeter basic 30 Crison.
- Un rotavapor con una bomba de vacío, filtros de microfibras de vidrio con un tamaño de poro de 1.5 μm y un soporte para el filtro



Ilustración 6. Rotavapor utilizado para la reducción de volumen



Ilustración 7. Equipo utilizado para el filtrado formado tras la adición del metanol

- Un cristizador con un volumen de 500 mL.

7.9. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para la determinación de ST y SV se pesó la muestra y se introdujo en un horno a 105 °C durante el tiempo necesario para evaporar todos los líquidos presentes. Tras esto, la muestra se pesa nuevamente para determinar los sólidos totales por diferencia de pesada. Posteriormente, la muestra se llevó a una mufla a 550 °C para eliminar los sólidos volátiles. Después de este proceso, la muestra se pesa de nuevo, y la diferencia entre el peso inicial de los sólidos totales y el peso de los sólidos no volátiles corresponde a los sólidos volátiles.

La concentración de ectoína en las muestras líquidas se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando un cromatógrafo 717 plus auto-sampler (Waters) con una columna Amino Spherisorb. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/agua (75:25), un flujo de 0.6 mL/min y una temperatura de columna constante de 40 °C.

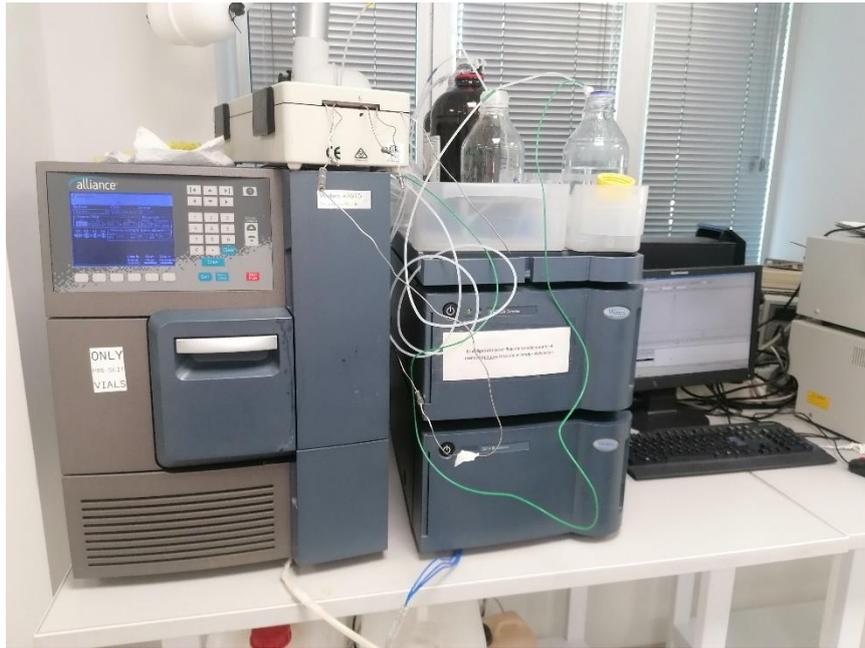


Ilustración 8. Cromatógrafo de líquidos utilizado para la determinación de las concentraciones de ectoína

Para cuantificar la concentración de ectoína de la biomasa inicial, se empleó un protocolo estándar desarrollado por el grupo de investigación, en el que se centrifugan 2 mL del caldo de cultivo con la biomasa a 9000 G durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se agregan 1.8 mL de una solución de NaCl al 6% en agua tipo 1 (desionizada) para resuspender la biomasa con un vortex, se centrifuga nuevamente a 9000 G durante 10 minutos y se descarta de nuevo el sobrenadante, repitiendo el lavado de la biomasa.

Tras los lavados, se añaden 1.8 mL de etanol al 70% a la biomasa, se resuspende y se añaden 25-30 mg de zirconia. Esta mezcla se lleva a un homogeneizador de bolas Minibeadbeater donde se agita durante 10 minutos para romper las células. Una vez liberada la ectoína, se centrifuga nuevamente, se desecha la biomasa residual y el sobrenadante se analiza mediante HPLC para determinar la concentración de ectoína.

8. RESULTADOS EXPERIMENTALES

8.1. BIO-MILKING

Para comenzar este experimento, se debe obtener la solución con ectoína con la que se va a trabajar. La concentración inicial de ectoína en las células es de 272.4 mg/kg. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo un proceso de bio-milking en el que se estudiaron diferentes variables, en concreto la relación agua/biomasa y tiempo de agitación, con el objetivo de optimizar esta primera etapa.

La figura 6 muestra los resultados de la concentración de ectoína obtenidos a partir de las diferentes condiciones de bio-milking analizadas. Como cabía esperarse, a medida que aumenta el volumen de agua utilizado, disminuye la concentración de ectoína, obteniéndose una concentración máxima de 259 mg/L en el bio-milking con la relación agua/biomasa 1:4 (24 % de recuperación de ectoína). Aumentar la cantidad de agua en la relación aumenta el rendimiento de la extracción, pero disminuye la concentración. Sin embargo, como la concentración final obtenida es tan baja, se ha primado trabajar en la posterior purificación con la concentración mayor posible. Además, hay que tener en cuenta que las células tras el bio-milking se devuelven al reactor para seguir acumulando ectoína, con lo que la ectoína no extraída vuelve a poder recuperarse en la siguiente extracción.

Respecto al tiempo de agitación, se observó un aumento entre un 14 y un 20% en la concentración de ectoína en los primeros tiempos de agitación. Sin embargo, en las tres relaciones agua/biomasa utilizadas, a partir de los 5 minutos de tratamiento no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de ectoína.

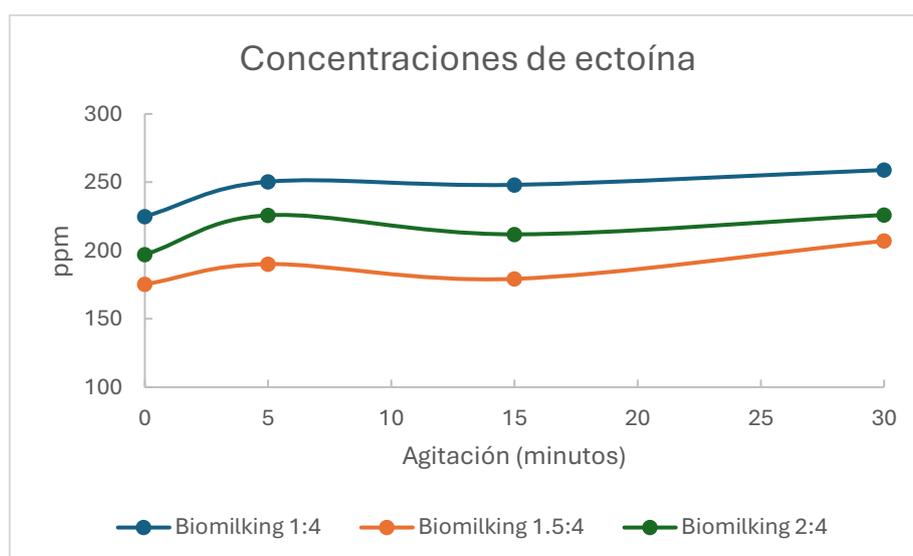


Ilustración 9. Concentraciones de ectoína en ppm para las diferentes relaciones agua/biomasa de las muestras y diferentes tiempos de agitación

Con la relación líquido/sólido de 1:4 tras 5 minutos de agitación fue posible extraer una concentración de ectoína adecuada (250 mg/L) para utilizar como caldo inicial en el proceso de purificación de ectoína (un rendimiento de extracción de ectoína de 23 %). A pesar de que el rendimiento de extracción es menor, no buscamos la máxima extracción en esta etapa, si no la máxima concentración con un rendimiento aceptable. Por ello, se puede considerar que una relación agua/biomasa 1:4 y un tiempo de agitación de 5 minutos permiten liberar al medio una concentración de ectoína lo suficientemente alta para llevar a cabo el proceso de purificación posterior.

Una vez realizado este proceso, se seleccionaron como mejores condiciones para el bio-milking una relación de agua/biomasa de 1:4 y un tiempo de agitación de 5 minutos. Si bien es cierto que a mayores tiempos de agitación se obtuvieron mayores concentraciones de ectoína, desde el punto de vista práctico para la optimización y el escalado del proceso a nivel industrial, reducir el tiempo de agitación hace el proceso más sencillo y abarata costes. Las concentraciones iniciales para los ST, SV y ectoína en las condiciones de biomilking seleccionado y que servirán como materia prima para el resto de las etapas del proceso son 21.8, 1.45 y 189.44 mg/L respectivamente. Se parte de 500 mL de disolución, con lo que las cantidades iniciales son 10900 mg de ST, 725 mg de SV y 94.72 mg de ectoína. El valor de concentración de ectoína es diferente al obtenido durante el bio-milking debido a que se utilizaron muestras diferentes y esta concentración puede variar en función de como esté la biomasa en ese momento. La pureza inicial de la ectoína es de 0.87 %.

8.2. ELECTRODIÁLISIS

A continuación, se llevó a cabo un proceso de electrodiálisis, con el objetivo de reducir el contenido de sal de las muestras obtenidas tras el bio-milking. Se utiliza el mismo caldo de cultivo, pero se alcanzaron resultados ligeramente diferentes en ambos experimentos en la electrodiálisis. La diferencia de estos valores en ambos experimentos puede ser debida al montaje y funcionamiento del equipo de electrodiálisis o al tiempo de aplicación de la misma. En ambos casos se logró una reducción de sales del 98%, una reducción de SV de 76% y 74 % en el experimento con ácido sulfúrico y con ácido clorhídrico, respectivamente y un porcentaje de recuperación de ectoína del 66 % en ambos experimentos.

En los dos experimentos se observa una pérdida de ectoína en el proceso de electrodiálisis, por lo que sería necesario evaluar diferentes variables de operación en trabajos futuros para reducir estas pérdidas.

Como se puede observar en la Ilustración 12, la conductividad de la muestra disminuyó de forma rápida en los primeros minutos del proceso haciéndose más lenta a medida que

el proceso avanzaba. Con el proceso de electrodiálisis fue posible reducir la conductividad de la muestra de 32 mS/cm hasta 0.08 mS/cm.

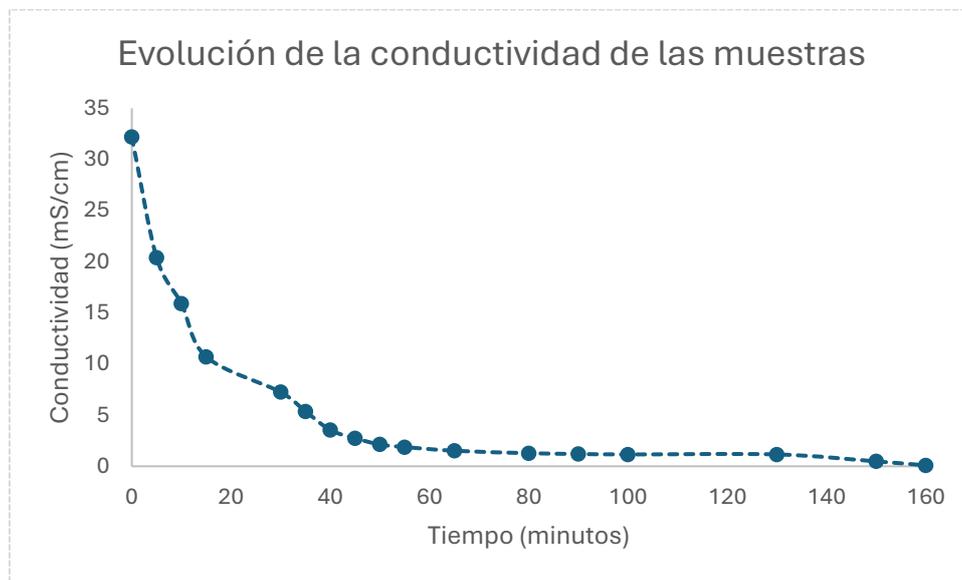


Ilustración 10. Evolución de la conductividad durante la electrodiálisis

Tras el paso por el equipo de electrodiálisis, se analizó el contenido en ST, SV y ectoína de las diferentes corrientes del proceso en los experimentos de sulfúrico y clorhídrico, cuyos resultados se recogen respectivamente en las tablas 1 y 2:

Tabla 1. Resultados tras la electrodiálisis en el experimento con ácido sulfúrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Inicial	21.8	1.45	7.6	32	189.44	500	94.72	10900	725
Electrodiálisis	1.1	0.5	6.68	1.36	178.05	350	62.32	450	175
Disolución concentrada	-	-	8.47	25.4	42.19	500	21.10	-	-

Tabla 2. Resultados tras la electrodiálisis en el experimento con ácido clorhídrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Inicial	21.8	1.45	7.6	32	189.44	500	94.72	10900	725
Electrodiálisis	0.9	0.54	5.57	1.02	179.65	350	62.88	315	189
Disolución concentrada	-	-	8.84	30.2	20.93	500	10.46	-	-

Como se observa en la Tabla 1, la del ácido sulfúrico, el contenido en sólidos totales se ha reducido de 10900 mg hasta 450 mg, lo que indica que se ha eliminado una gran parte del NaCl de la muestra inicial. La cantidad de sólidos volátiles pasa de 725 mg a 175 mg, Por lo tanto, se puede concluir que el objetivo de esta etapa de desalinización se ha

logrado. Respecto a la concentración de ectoína, el porcentaje de recuperación de ectoína fue de 66 % respecto a la muestra inicial, lo que supone un 34% de pérdida de ectoína. Este resultado indica una mala recuperación de ectoína, siendo necesario mejorar el proceso modificando algún parámetro o condición del proceso, como volúmenes mayores de las corrientes, para reducir este porcentaje y maximizar la recuperación de ectoína. Respecto a la pureza de la ectoína, se pasó de un 0.87 % de pureza a un 13.8 %.

Los resultados de la tabla 2 correspondientes al segundo experimento con ácido clorhídrico muestran que el contenido en sólidos totales se ha reducido de 10900 mg hasta 315 mg, datos muy parecidos a la electrodiálisis realizada en el experimento con ácido sulfúrico (reducción de ST de 10900 mg a 450 mg). La cantidad de sólidos volátiles ha pasado de 725 mg a 189 mg. Podemos concluir también que se ha logrado el objetivo en esta etapa de desalinización. El porcentaje de recuperación de ectoína en este experimento es de un 66%, como el obtenido previamente. Al igual que en el estudio con ácido sulfúrico, sería interesante evaluar otros parámetros del proceso para optimizar esta etapa de electrodiálisis con el objetivo de reducir la pérdida de ectoína al máximo. La pureza de la ectoína en este caso pasó de un 0.87 % a un 20 %.

8.3. INTERCAMBIO IÓNICO

Una vez obtenida la muestra sin sales, se procedió al paso de esta por la columna de intercambio iónico. Para que la muestra quede retenida es necesario acidificarla antes por lo que se ajustó el pH a 2 con ácido sulfúrico en el primer experimento y con ácido clorhídrico en el segundo. Una vez adsorbida la ectoína en la resina, se eluyó con una disolución de NaOH 1.3 M obteniéndose cuatro fracciones diferentes en las que se analizó el contenido en ST, SV y ectoína. Los resultados se pueden observar en las Tablas 3 y 4 para el ácido sulfúrico y clorhídrico respectivamente.

Tabla 3. Resultados de ST, SV, ectoína, pH y conductividad tras la elución en columna en el experimento del ácido sulfúrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Tras acidificar la muestra (pH=2)	1.3	0.5	2.03	2.18	177.89	350	62.26	450	175
Muestra eluida tras la retención	1.27	0.8	1.97	2.87	-	350	-	444.5	280
Elución 1			13.63	124.4	139.80	250	34.95		
Elución 2			13.8	187.1	34.17	250	8.54		
Elución 3			13.73	196.8	0	250	0		
Elución 4			13.81	196.3	0	250	0		

Tabla 4. Resultados de ST, SV, ectoína, pH y conductividad tras la elución en columna en el experimento del ácido clorhídrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Tras acidificar la muestra (pH=2)	1.89	0.35	1.96	2.24	168.72	350	59.05	661.5	122.5
Muestra eluida tras la retención	1.82	0.31	1.08	7.81	-	350	-	637	108.5
Fracción 1			13.60	127.3	134.02	250	33.51		
Fracción 2			13.67	178.6	22.17	250	5.54		
Fracción 3			13.66	180.3	0	250	0		
Fracción 4			13.64	181.7	0	250	0		

Los resultados obtenidos mostraron que el uso de ambos ácidos en bajas concentraciones apenas degrada la ectoína (62.26 mg en el experimento con ácido sulfúrico y 59.05 mg/L en el de ácido clorhídrico, siendo el mismo volumen de entrada para ambos, de 0.35 L). En ambos experimentos sólo se detectó ectoína en las dos primeras fracciones recuperadas. Una vez se ha recuperado toda la ectoína adsorbida en la resina, esta se regeneró para lo que se utilizó en el primer experimento ácido sulfúrico 0.5 M y en el segundo ácido clorhídrico al 6%.

Como se puede observar en la tabla 3, tras acidificar la muestra la concentración de ectoína (62.26 mg) detectada es prácticamente la misma que la obtenida tras el proceso de electrodiálisis (62.32 mg) por lo que se puede concluir que el ácido sulfúrico a bajas concentraciones (1.5 M) no parece tener un efecto de degradación en la concentración de ectoína. Asimismo, como era de esperar, no se detectó ectoína en la muestra una vez pasada por la columna lo que indica que ha quedado retenida en la resina de intercambio iónico.

La información observable en la Tabla 4 nos muestra qué, tras la acidificación de la muestra, la concentración de ectoína detectada (59.05 mg) es ligeramente diferente que la obtenida tras el proceso de electrodiálisis (62.88 mg), por lo que se concluye que el ácido clorhídrico a bajas concentraciones (1.5 M) degrada un poco la concentración de ectoína (6 % de degradación). En este experimento, y como era de esperar, tampoco se detectó ectoína en la muestra una vez pasada por la columna, indicador de que toda la ectoína ha quedado retenida en la resina de intercambio iónico.

Los resultados mostraron que el uso de ácido sulfúrico permite una regeneración más eficaz de la resina de intercambio iónico, alargando su vida útil. Esto podemos saberlo gracias a las concentraciones de sólidos en las muestras. En el caso del ácido clorhídrico

se han obtenido unas cantidades de sólidos muy altas, indicador de que la columna no está limpia y arrastra suciedad.

Respecto a las fracciones obtenidas tras pasar NaOH 1.3M como eluyente, se observó la presencia de ectoína en las dos primeras fracciones mientras que en las otras dos no se detectó este compuesto. El rendimiento de recuperación de ectoína en esta etapa es de aproximadamente del 70 %, respecto a la etapa anterior en el experimento con ácido sulfúrico y 66 % en el caso del clorhídrico. Este porcentaje de recuperación está lejos al porcentaje esperado de recuperación de ectoína.

8.4. PRECIPITACIÓN CON METANOL

Una vez se ha terminado el paso por la columna de intercambio iónico, las fracciones que contienen ectoína se juntan y evaporan hasta eliminar el 95 % del agua presente.

A la disolución resultante se le añaden 125 mL de metanol y se filtra.

Tras el filtrado se analizaron de nuevo los ST, SV y la concentración de ectoína en esta etapa del proceso, como se muestra en la tabla 5:

Tabla 5. Resultados finales de ST, SV, concentración de ectoína, pH y conductividad en el experimento con ácido sulfúrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Neutralizado	62.74	0.95	7.26	53.4	77.48	500	43.49	31370	475
Precipitación con metanol	0.65	0.26	5.81	0.257	184.08	125	23.01	81.25	32.5

Como se observa en la Tabla 5, la muestra inicial proveniente del intercambio iónico, presenta una elevada cantidad de sólidos totales y de sólidos volátiles, lo que indica que la resina de intercambio iónico no ha cumplido la función esperada, eliminar sólidos volátiles diferentes de la ectoína. La relación ectoína/SV se ha reducido con el paso por el intercambio iónico, en lugar de aumentar como estaba previsto. Sin embargo, tanto los sólidos totales como los sólidos volátiles presentes en la muestra disminuyen considerablemente en la etapa de precipitación con metanol, con una reducción de sales del 99.8% y una reducción de SV del 93%. En esta etapa se consigue un elevado aumento de la pureza de la ectoína, que pasa de un 0.14% a un 28%. En la precipitación con metanol, el rendimiento de recuperación de ectoína respecto al neutralizado es del 53 %, resultado que indica que la adición de metanol para la precipitación de sulfatos afecta a la concentración de ectoína, debido a que, probablemente, la ectoína quede retenida en el precipitado. En futuros experimentos sería interesante utilizar métodos que impidan la coprecipitación de la ectoína.

11.5. SEGUNDA ELECTRODIÁLISIS

Los resultados obtenidos durante esta segunda electrodiálisis en el experimento con ácido clorhídrico se muestran en la tabla 6:

Tabla 6. Resultados finales de ST, SV, concentración de ectoína, pH y conductividad en el experimento con ácido clorhídrico

Muestra	ST (g/kg)	SV (g/kg)	pH	Conductividad (mS/cm)	Ectoína (mg/L)	Volumen (mL)	Ectoína (mg)	ST (mg)	SV (mg)
Neutralizado	54.41	2.98	6.84	76.6	92.84	500	39.05	27205	1490
Electrodiálisis	0.23	0.18	6.49	0.5	89.92	400	35.97	92	72
Disolución concentrada	-	-	7.69	25.9	1.25	500	0.63	-	-

En la tabla 6 se puede observar nuevamente la elevada concentración de sólidos totales y sólidos volátiles en la disolución procedente del intercambio iónico, que confirma la no efectividad de esta etapa de proceso. En la segunda electrodiálisis, sin embargo, el contenido de sólidos totales disminuye de 27205 mg hasta 92 mg, un porcentaje de reducción mayor que en la anterior electrodiálisis (99.7 % frente a 97 %) y mejor también que en la electrodiálisis del experimento con ácido sulfúrico (96 %). Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad del proceso de electrodiálisis en muestras con un alto contenido en sales (en las muestras iniciales teníamos 10175 mg de sales y en la segunda electrodiálisis tenemos 25715 mg). La eliminación de sales en esta segunda electrodiálisis es de 99.9%, pero también hay una elevada eliminación de SV del 95%. En esta etapa se consigue un elevado aumento de la pureza de la ectoína, que pasa de un 0.14% a un 39%.

El porcentaje de recuperación de ectoína durante esta segunda electrodiálisis es de 92%, un porcentaje mayor que en la primera electrodiálisis (66%). Comparándolo con la precipitación con metanol del experimento con ácido sulfúrico, podemos observar que el porcentaje de recuperación de ectoína es menor en la precipitación con metanol (53 %) que al realizar una segunda electrodiálisis (92%).

11.6. CRISTALIZACIÓN

Por último, en ambos experimentos, se evapora la disolución con la muestra para obtener el producto final.

La ectoína recuperada con la precipitación con metanol es 23.01 mg mientras que con la segunda electrodiálisis en el experimento con ácido clorhídrico es del 35.97 mg. La pureza de este producto se calculó en función de la relación de mg de ectoína obtenidos y de mg de ST, obteniendo una pureza del 28.3 % en el experimento con ácido sulfúrico y 39.1 % en el experimento con ácido clorhídrico.



Ilustración 11 Ectoína obtenida tras el proceso de purificación.

El proceso continuará siendo optimizado en un futuro para poder alcanzar una recuperación de producto óptimo y una mejor pureza.

12. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

Como conclusión a este trabajo fin de máster podemos afirmar que los dos procesos de purificación evaluados permiten recuperar un porcentaje de ectoína bastante bajo (24.3 % y 38.0 % respectivamente para los experimentos con ácido sulfúrico y ácido clorhídrico con una pureza del 28.3 y 39 %), respecto al caldo inicial (0.87 % de pureza). El mayor problema a nivel experimental han sido las pérdidas de esta en las diferentes etapas del proceso. Si bien se obtienen en ambos casos resultados esperanzadores, será necesario optimizar las condiciones de todas las unidades del proceso para aumentar el rendimiento de recuperación de ectoína y conseguir aumentar la pureza del producto. Por ello, en trabajos futuros será interesante tratar de aumentar estos porcentajes, reduciendo por ejemplo el aporte de sales que se generan durante el proceso y evitando posibles degradaciones.

Los peores resultados se han obtenido en la etapa de intercambio iónico, que no ha cumplido con la eliminación de sólidos volátiles distintos de la ectoína para la que estaba diseñada. La pureza de la ectoína ha disminuido considerablemente en esta etapa del proceso. Es necesario investigar para conocer las razones de este mal funcionamiento.

Finalmente, respecto al uso de diferentes ácidos en el proceso de purificación, los resultados han mostrado que el uso de ácido clorhídrico durante el proceso permite alcanzar rendimientos y purezas ligeramente superiores a los obtenidos con ácido sulfúrico en un proceso más sencillo y económicamente más rentable ya que evita el uso de disolventes orgánicos y su consiguiente gestión.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Bačėnainaitė, D., Džermeikaitė, K., Antanaitis, R., 2022. Global Warming and Dairy Cattle: How to Control and Reduce Methane Emission. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12192687>
- Bethlehem, L., van Echten-Deckert, G., 2021. Ectoines as novel anti-inflammatory and tissue protective lead compounds with special focus on inflammatory bowel disease and lung inflammation. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105389>
- Cantera, S., Lebrero, R., Rodríguez, S., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2017. Ectoine bio-milking in methanotrophs: A step further towards methane-based bio-refineries into high added-value products. *Chem. Eng. J.* 328, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.027>
- Cantera, S., Muñoz, R., Lebrero, R., López, J.C., Rodríguez, Y., García-Encina, P.A., 2018. Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.021>
- Carmona-Martínez, A.A., Marcos-Rodrigo, E., Bordel, S., Marín, D., Herrero-Lobo, R., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2021. Elucidating the key environmental parameters during the production of ectoines from biogas by mixed methanotrophic consortia. *J. Environ. Manage.* 298. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113462>
- CHEERS: nuevo Proyecto Europeo de Horizonte Europa empieza - Innovarum. (n.d.). Retrieved May 9, 2024, from <https://innovarum.es/es/horizon-europees/cheers-nuevo-proyecto-europeo-de-horizonte-europa-empieza/>
- Czech, L., Hermann, L., Stöveken, N., Richter, A.A., Höppner, A., Smits, S.H.J., Heider, J., Bremer, E., 2018. Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: Genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes (Basel)*. 9, 1–58. <https://doi.org/10.3390/genes9040177>
- Deep Purple. (n.d.). Retrieved May 9, 2024, from www.deep-purple.eu
- Dubencovs, K., Suleiko, A., Suleiko, A., Glukhikh, S., Vanags, J., 2022. Medium formulation and fed-batch cultivation of *Methylosinus trichosporium*. *Key Eng. Mater.* 933, 179–184.
- Ectoína - Wikipedia, la enciclopedia libre. (n.d.). Retrieved May 1, 2024, from <https://es.wikipedia.org/wiki/Ecto%C3%ADna>
- Estrada, J.M., Lebrero, R., Quijano, G., Pérez, R., Figueroa-González, I., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2014. Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chem. Eng. J.* 253, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053>

- Feng, Y., Qiu, M., Shao, L., Jiang, Y., Zhang, W., Jiang, W., Xin, F., Jiang, M., 2024. Strategies for the biological production of ectoine by using different chassis strains. *Biotechnol. Adv.* 70, 108306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108306>
- Girigoswami, K., Harini, K., Agraharam, G., Girigoswami, A., 2023. Slowdown of aging and neurodegenerative diseases by extremolytes, Stem Cells and Signaling Pathways. *INC.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18800-8.00003-4>
- IPCC, 2023: *Climate Change 2023: Synthesis Report*. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 35-115, doi: [10.59327/IPCC/AR6-9789291691647](https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647).
- Jackson, R.B., Sauniois, M., Bousquet, P., Canadell, J.G., Poulter, B., Stavert, A.R., Bergamaschi, P., Niwa, Y., Segers, A., Tsuruta, A., 2020. Increasing anthropogenic methane emissions arise equally from agricultural and fossil fuel sources. *Environ. Res. Lett.* 15. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab9ed2>
- Jeffry, L., Ong, M.Y., Nomanbhay, S., Mofijur, M., Mubashir, M., Show, P.L., 2021. Greenhouse gases utilization: A review. *Fuel* 301, 121017. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121017>
- Li, P., Huang, Y., Miao, L., Zhu, Z., Shi, Z., 2024. Protective effects of ectoine on articular chondrocytes and cartilage in rats for treating osteoarthritis. *Plos one.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299351>
- Mundra, I., Lockley, A., 2024. Emergent methane mitigation and removal approaches: A review. *Atmos. Environ.* X 21, 100223. <https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2023.100223>
- Ng, HS., Wan, PK., Kondo, A., Chang, JS., Lan, JCW., 2023. Production and recovery of ectoine. *Processes.* <https://doi.org/10.3390/pr11020339>
- Ngoc Pham, D., Duc Nguyen, A., Hoang Anh Mai, D., Yeol Lee, E., 2023. Development of a novel methanotrophic platform to produce ectoine from methane and lignocellulose-derived sugars. *Chem. Eng. J.* 463, 142361. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142361>
- Oren, A., 2013. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations and acidic proteomes. *Extreme Microbiology.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00315>
- Orhan, F., Ceyran, E., Akincioglu, A., 2023. Optimization of ectoine production from *Nesterenkonia xinjiangensis* and one-step ectoine purification. *Bioresour. Technol.* 371. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128646>
- Patel, A., Shah, A.R., 2021. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *J. Bioresour. Bioprod.* 6, 108–128. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.001>
- Pérez, V., Moltó, J.L., Lebrero, R., Muñoz, R., 2022. Ectoine production from

biogas: A sensitivity analysis. Effect of local commodity prices, economy of scale, market trends and biotechnological limitations. *J. Clean. Prod.* 369. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133440>

- Reshetnikov, A.S., Rozova, O.N., Trotsenko, Y.A., But, S.Y., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I.I., 2020. Ectoine degradation pathway in halotolerant methylotrophs. *PLoS One* 15, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232244>
- UNEP, 2021. Global methane assessment: Benefits and costs of mitigating methane emissions. UNEP - UN Environment Programme. Available at: <https://www.unep.org/resources/report/global-methane-assessment-benefits-and-costs-mitigating-methane-emissions>
- Yao, X., Wang, J., Hu, B., 2023. How methanotrophs respond to pH: a review of ecophysiology. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1034164>
- Zhang, H., Liang, Z., Zhao, M., Ma, Y., Luo, Z., Li, S., Xu, H., 2022. Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for ectoine production with a fermentation strategy of supplementing the amino donor. *Front. Bioeng.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.824859>

14. ANEXO

Listado de Ilustraciones

Ilustración 1. Emisiones globales anuales de la GEI antropogénico entre 1990 y 2020. Fuente: Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPPC 2023).....	8
Ilustración 2. Fuentes antropogénicas de emisión de metano. Adaptado de Mundra and Lockley (2024).	9
Ilustración 3. Estructura química de la ectoína. (Ectoína-Wikipedia, La Enciclopedia Libre).	10
Ilustración 4. Reactor de Flujo de Taylor para la producción de ectoína empleado en el laboratorio del Instituto en Procesos Sostenibles (Universidad de Valladolid).	13
Ilustración 5. Funcionamiento esquemático de la electrodiálisis	18
Ilustración 6. Montaje de la columna de intercambio iónico	22
Ilustración 7. Equipo de electrodiálisis.....	21
Ilustración 8. Rotavapor utilizado para la reducción de volumen	22
Ilustración 9. Equipo utilizado para el filtrado formado tras la adición del metanol	23
Ilustración 10. Cromatógrafo de líquidos utilizado para la determinación de las concentraciones de ectoína	24
Ilustración 11. Concentraciones de ectoína en ppm para las diferentes relaciones agua/biomasa de las muestras y diferentes tiempos de agitación	25
Ilustración 12. Evolución de la conductividad durante la electrodiálisis	27
Ilustración 13 Ectoína obtenida tras el proceso de purificación.	32

Listado de Tablas

Tabla 1. Resultados tras la electrodiálisis en el experimento con ácido sulfúrico . ¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 2. Resultados tras la electrodiálisis en el experimento con ácido clorhídrico	¡Error! Marcador no definido.8
Tabla 3. Resultados de ST, SV, ectoína, pH y conductividad tras la elución en columna en el experimento del ácido sulfúrico.....	¡Error! Marcador no definido.9
Tabla 4. Resultados de ST, SV, ectoína, pH y conductividad tras la elución en columna en el experimento del ácido clorhídrico	30
Tabla 5. Resultados finales de ST, SV, concentración de ectoína, pH y conductividad en el experimento con ácido sulfúrico.....	31
Tabla 6. Resultados finales de ST, SV, concentración de ectoína, pH y conductividad en el experimento con ácido clorhídrico.....	32