

## Resum

Les cada vegada més dificultats que presenta l'ús de derivats del petroli, tant a nivell ambiental com de consum de recursos, obliga a la societat tecnològica a buscar alternatives netes i sostenibles. Per aquesta via camina la química verda (*Green Chemistry*) i les biorefineries. Aquesta alternativa proposa l'obtenció de productes químics i nous materials de forma poc contaminat i sostenible.

Uns possibles substituïts dels polímers convencionals són els biopolímers, materials polimèrics d'origen natural amb els que es poden obtenir plàstics, fibres, elastòmers i molts altres productes d'interès industrial. Un dels més prometedors gràcies a les seves propietats, és la poli-èpsilon-lisina, de gran valor productiu en el seu àmbit.

Actualment són molts els estudis relacionats amb la producció de poli-èpsilon-lisina i de les aplicacions pràctiques que aquesta podria tenir com a producte de consum.

Aquest projecte té com a objectiu el de dissenyar un bioreactor per a una planta pilot capaç de produir poli-èpsilon-lisina a partir de la fermentació de glucosa, considerant que opera en condicions òptimes de treball. El disseny s'ha dut a terme per obtenir 900 kg de biopolímer l'any.

El procés que es durà a terme és la fermentació de la glucosa per la bactèria *Streptomyces albulus* per produir poli-èpsilon-lisina, segons les dades científiques que Kahar i col·laboradors varen publicar l'any 2001. Per això, té una importància cabdal conèixer la cinètica i les condicions ambientals, així com el medi de cultiu de la bactèria.

S'ha seleccionat un bioreactor de tanc agitat alimentat per lots d'acer inoxidable AC316L. A més, en el disseny del mateix s'ha inclòs un sistema d'aeració, ja que les bactèries necessiten oxigen per poder dur a terme la reacció. S'ha determinat que el sistema d'agitació ha d'estar format per tres discos d'igual diàmetre equipats amb sis pales Rushton. Per a volum d'operació de 500 L, les dimensions del tanc són de 1750x906 mm i té un volum real de 750 L, el dimensionat del bioreactor s'ha fixat en relació als objectius de producció.

El control de l'operació de es farà amb sondes de temperatura i pH. Per mantenir la temperatura adequada (30 °C) el bioreactor disposarà d'una resistència elèctrica de 1000 W. Igualment s'ha previst un sistema de control automàtic del pH per addició de NaOH amb una bomba peristàltica.

També s'ha realitzat una simulació numèrica del procés que es durà a terme, obtenint 20 kg de poli-èpsilon-lisina per cicle de treball, amb una duració de 6 dies per cicle.

El cost final de l'equip, que inclou el disseny, fabricació, muntatge i impostos, és de 28974,98 euros.



## Sumari

<b>RESUM</b>	<b>1</b>
<b>SUMARI</b>	<b>3</b>
<b>1. GLOSSARI</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b>	<b>7</b>
2.1. Objectius del projecte .....	8
2.2. Abast del projecte.....	9
<b>3. INTRODUCCIÓ ALS BIOPOLÍMERS</b>	<b>11</b>
3.1. La química sostenible [4].....	11
3.2. Les biorefineries [8].....	13
3.3. Els biopolímers [9].....	16
3.3.1. Història dels biopolímers.....	16
3.3.2. Obtenció de biopolímers .....	19
3.3.3. Terme d'innovació.....	19
3.3.4. Tipus de biopolímers [12].....	20
3.3.5. La poli-èpsilon-lisina [2].....	23
<b>4. REACCIONS PER FERMENTACIÓ [1]</b>	<b>27</b>
4.1. Creixement cel·lular, consum de substrats i obtenció de productes.....	27
4.2. Modelització de sistemes bioquímics.....	28
4.2.1. Models No Estructurats.....	29
4.2.2. Models Estructurats .....	29
4.2.3. Models Segregats .....	30
4.3. Fermentacions aeròbiques i anaeròbiques.....	31
4.4. Cinètica de la reacció [1].....	31
4.5. Característiques cinètiques, termodinàmiques i de transferència de matèria [1].....	34
4.6. Bactèries productores de poli-èpsilon-lisina [19] .....	34
4.6.1. Streptomyces albulus [20].....	36
4.6.2. Medis de cultiu de Streptomyces albulus.....	37
4.7. Estat de l'art de la bioproducció de poli-èpsilon-lisina [2].....	37
<b>5. INTRODUCCIÓ ALS BIOREACTORS</b>	<b>39</b>
5.1. Tipus de bioreactors.....	39
5.1.1. BIOREACTOR DE TANC AGITAT .....	39
5.1.2. BIOREACTOR DE COLUMNA DE BOMBOLLES.....	43

5.1.3.	ALTRES TIPUS DE BIOREACTORS .....	43
<b>6.</b>	<b>MATERIALS I EQUIP</b> .....	<b>45</b>
6.1.	Elecció del bioreactor.....	45
6.1.1.	Vas.....	45
6.1.2.	Geometria.....	45
6.1.3.	Materials .....	45
6.1.4.	Vàlvules i ports – Sistemes d'alimentació i de sortida.....	46
6.2.	Sistema de control de temperatura .....	46
6.3.	Sistemes de control de paràmetres bioquímics: pH.....	47
<b>7.</b>	<b>DISSENY DEL BIOREACTOR</b> .....	<b>49</b>
7.1.	Paràmetres de disseny.....	51
7.1.1.	Càlcul de la capacitat de producció.....	51
7.1.2.	Geomètrics.....	51
7.1.3.	Aeració.....	52
7.1.4.	Agitació .....	53
7.1.5.	Introducció teòrica al càlcul del sistema d'agitació.....	56
7.1.6.	Càlculs numèrics.....	58
7.1.7.	Controls de temperatura i pH.....	60
7.2.	Dimensionat del bioreactor.....	60
7.3.	Simulació numèrica del procés.....	69
7.3.1.	Càlculs de productivitat i volums .....	69
<b>8.</b>	<b>CONDICIONS D'OPERACIÓ I SEGURETAT</b> .....	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>ESTUDI ECONÒMIC</b> .....	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>ESTUDI DE L'IMPACTE AMBIENTAL</b> .....	<b>75</b>
10.1.	Càlcul de les emissions del procés.....	75
10.2.	Ecoindicador 99.....	76
<b>11.</b>	<b>ORGANITZACIÓ DEL PROJECTE</b> .....	<b>79</b>
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>81</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>83</b>
	Referències bibliogràfiques .....	83
	Bibliografia complementària .....	86

# 1. Glossari

D: diàmetre de l'impulsor (m)

$K_s$ : Constant de Monod (g/L)

m: Coeficient de manteniment i el rendiment entre les cèl·lules obtingudes i el substrat consumit.

N: velocitat d'agitació (rpm)

$N_a$ : Número d'Aeració

$N_p$ : Número de Potència

$P_g$ : Potència absorbida pel sistema d'aeració (W)

$Q_g$ : Cabal de gas ( $m^3/s$ )

Re: Número de Reynolds

$R_x$ : Velocitat de creixement de les cèl·lules ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )

$V_F$ : Volum del fermentador ( $m^3$ )

$V_g$ : Volum de gas en el fermentador ( $m^3$ )

$V_l$ : Volum de líquid en el fermentador ( $m^3$ )

$Y_{C/S}$ : Rendiment de cèl·lules contra substrat (kg/kg)

$Y_{P/S}$ : Rendiment de Poli-èpsilon-lisina contra substrat (kg/kg)

$\epsilon_g$ : Retenció de la fase gas

$\epsilon$ -PL: Poli-èpsilon-lisina

$\mu_m$ : Velocitat específica màxima de creixement ( $h^{-1}$ )

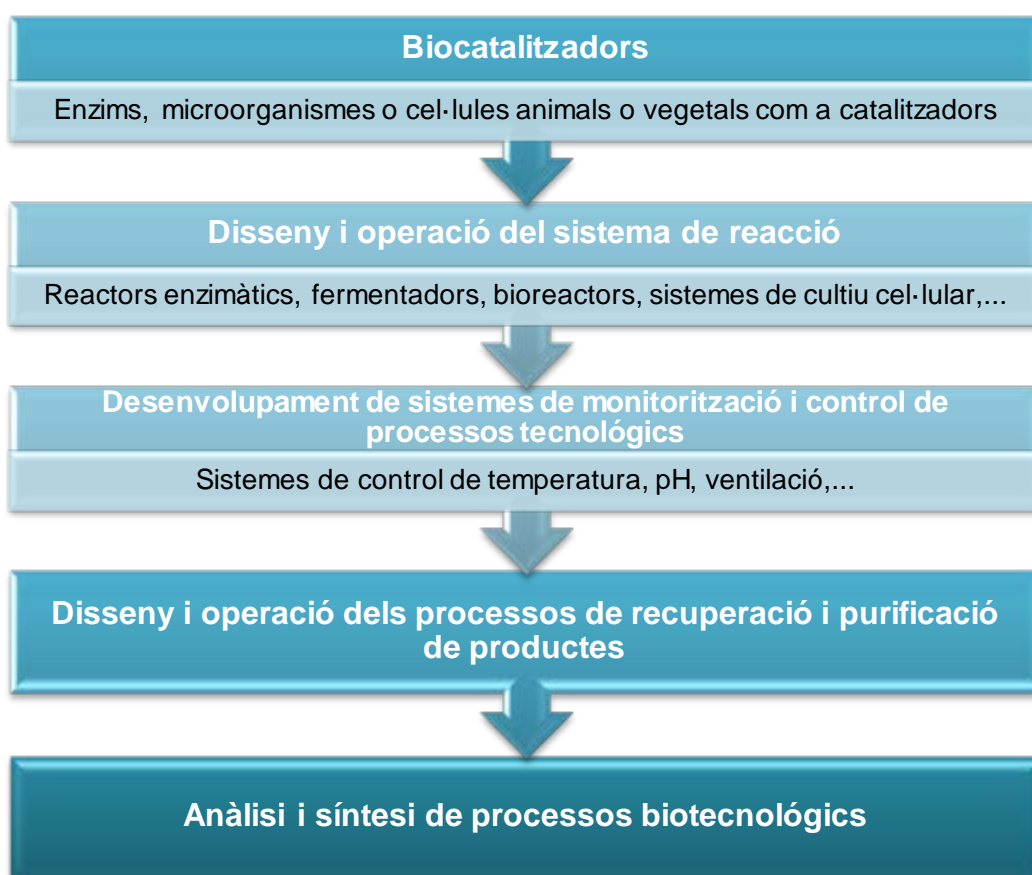
$\rho_g$ : densitat aparent del líquid ( $kg/m^3$ )



## 2. Introducció

Actualment existeix una gran diversitat de processos químics definits i provats a tots els nivells. Per poder arribar a una millora dels mateixos i a una optimització dels recursos disponibles, però, es fa necessari donar un major èmfasi als processos biotecnològics.

L'Enginyeria Bioquímica es concentra en el desenvolupament de noves tecnologies basades en la utilització de catalitzadors d'origen biològic, aplicant els principis de l'Enginyeria Química als processos biològics des de nivell molecular i cel·lular a la producció de productes d'interès. Seguidament es presenta un breu esquema del proveïment de l'Enginyeria Bioquímica:



Esquema 1 Esquema Proveïment de l'Enginyeria Bioquímica [1]

La definició de biotecnologia és la integració de microorganismes en un procés de producció.

El principal ús dels microorganismes d'ús industrial és produir una substància d'interès, poli-èpsilon-lisina en el nostre cas. Les condicions elementals que ha de reunir el microorganisme són: aquest ha de ser genèticament estable, ser capaç de créixer en cultius

a gran escala i fer-ho a la major velocitat possible. A més a més, una altra característica indispensable és que no ha de provocar cap tipus de reacció patògena a l'ésser humà o cap altre tipus d'ésser viu.

Aquest projecte pretén dissenyar un bioreactor que permeti la síntesi de poli-èpsilon-lisina, un producte amb unes propietats molt útils a la indústria alimentària i farmacèutica.

La poli-èpsilon-lisina és un biopolímer que es pot obtenir, gràcies a mètodes biotecnològics, a partir de productes d'altres bioprocessos, com ara el glucosa.

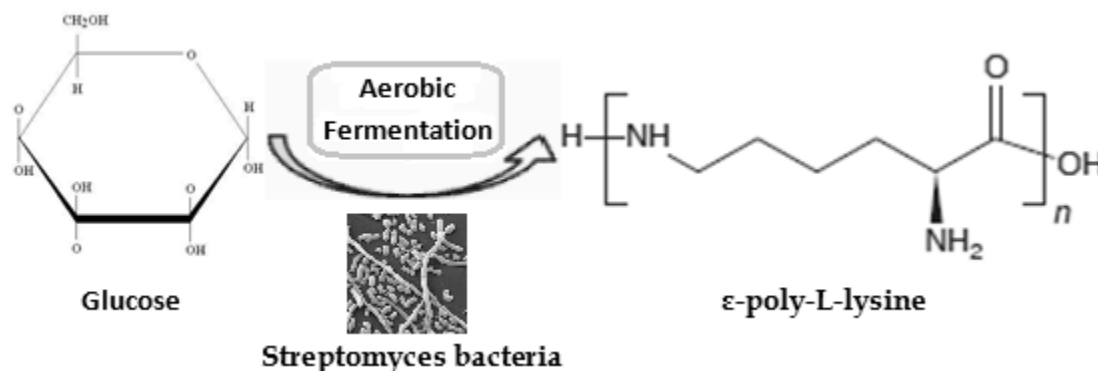


Figura 1 Bioproducció de poli-èpsilon-lisina a partir de glucosa [2]

## 2.1. Objectius del projecte

Durant el decurs del projecte s'aniran acomplint una sèrie d'objectius que permetran aconseguir l'objectiu principal del projecte.

- **Objectiu general del projecte:**  
Disseny i dimensionament d'un bioreactor per a la síntesi de 900kg/any de poli-èpsilon-lisina per fermentació bacteriana de glucosa per *Streptomyces albulus* [3].
- **Objectius particulars que es deriven del mateix:**
  - Trobar els paràmetres òptims d'operació: geometria, volums i cinètica.
  - Selecció dels materials del bioreactor.
  - Simulació matemàtica de la reacció de fermentació.
  - Detallar els controls de pH, temperatura i agitació.
  - Presentar els plànols i estructura del bioreactor.
  - Estudi econòmic del projecte.
  - Impacte mediambiental del bioreactor.

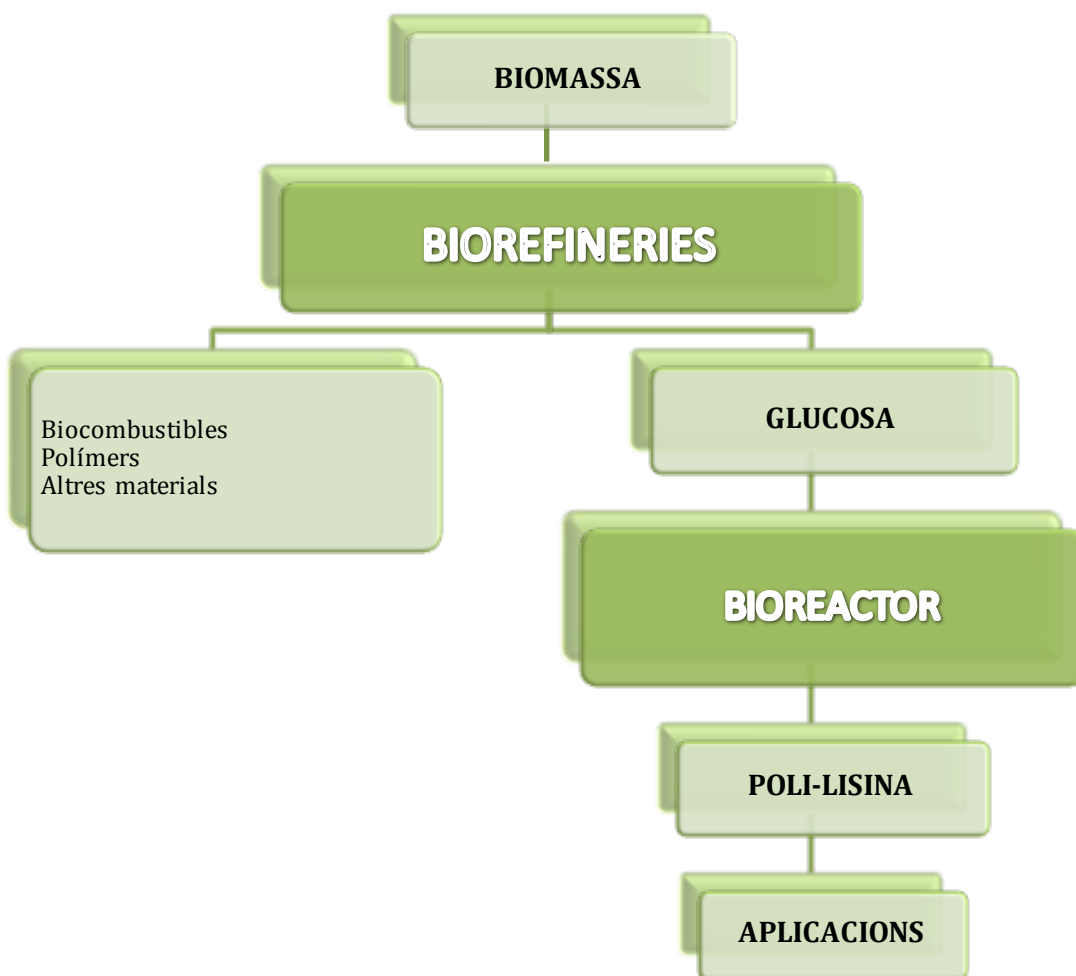


## 2.2. Abast del projecte

Per tal de poder assolir els objectius plantejats amb anterioritat en aquest projecte, en primer lloc és necessari crear una base de coneixements entorn als bioreactor.

L'abast d'aquest projecte va des d'una breu introducció teòrica en el món de la química sostenible i les biorefineries, a una visió general dels biopolímers més comuns i les seves propietats i en particular de la poli-èpsilon-lisina.

Amb l'objectiu de poder tenir un major enteniment del projecte i la seva estructura, a continuació es mostra un esquema que detalla la relació entre els diferents apartats.



*Esquema 2 Relació entre els diferents apartats del present treball*

També s'aprofundirà en les reaccions per fermentació i les bactèries escollides per a la bioreacció, així com les condicions òptimes de cultiu i de treball.

D'altra banda, es dissenyarà el bioreactor, basant-nos en les condicions de treball òptimes i la cinètica adequada de la reacció.

Es modelarà l'equip en 3D per tal de poder veure de la forma més real possible els elements que el componen.

Així mateix es durà a terme un estudi econòmic per tal de determinar la viabilitat del projecte.

Per últim es realitzarà una valoració de l'impacte ambiental de l'equip dissenyat.

## 3. Introducció als biopolímers

### 3.1. La química sostenible [4]

El concepte de Química Sostenible és cabdal avui dia a l'àmbit de l'Enginyeria Química. La introducció del concepte Química Sostenible (de l'anglès Green Chemistry) se li atribueix a Paul Anastas [5], quan el 1998 va descriure el desenvolupament de processos i productes que redueixin l'impacte ambiental, previnguin la contaminació i alhora siguin segurs per a l'ésser humà i el medi ambient.

La química sostenible està fortament lligada amb la sostenibilitat, que s'ha d'assolir gràcies al desenvolupament de noves tecnologies que promoguin els productes "mediambientalment responsables".

Els 12 principis de la química sostenible són:

- **Prevenió:** És millor prevenir la formació de residus que eliminar-los un cop generats.
- **Economia atòmica:** Els mètodes sintètics s'han de dissenyar per tal de maximitzar la incorporació al producte final de tots el materials utilitzats en el procés.
- **Mètodes de síntesi menys perillosos:** Sempre que sigui possible, s'han de dissenyar metodologies sintètiques que utilitzin i generin substàncies que no siguin tòxiques per a la salut i el medi ambient.
- **Disseny de productes més segurs:** Els productes químics s'han de dissenyar per mantenir l'eficàcia de la seva funció, però reduint-ne la toxicitat
- **Dissolvents i auxiliars més segurs:** L'ús de substàncies auxiliars (per exemple, dissolvents, agents de separació,...) hauria de ser innecessari en la mesura del possible e innocus quan en siguin necessaris.
- **Eficàcia energètica:** Els requeriments energètics han de ser tinguts en compte a causa del seu impacte mediambiental i econòmic, i han de ser minimitzats. Els mètodes sintètics han de realitzar-se a temperatura ambient sempre que sigui possible.
- **Ús de matèries primeres renovables:** Les matèries primeres han de ser renovables quan sigui possible tècnicament i econòmic.
- **Reduir l'ús de derivats:** S'ha d'evitar l'ús i generació de derivats (bloqueig de grups, protecció/desprotecció, modificació temporal de les condicions físiques/químiques) en la mesura del possible
- **Catàlisi:** Els reactius catalítics (tan selectius com sigui possible) són millors que els reactius estequiòmètrics
- **Disseny per a la degradació:** Els productes químics s'han de dissenyar de manera que la seva funció no persisteixi en el medi ambient i es degradin a productes innocus.

- Anàlisi a temps real: És necessari desenvolupar metodologies analítiques per permetre l'anàlisi a temps real, monitorització interna i control previ a la formació de substàncies perilloses
- Síntesis químiques més segures: S'han d'escollir les substàncies i la forma d'una substància utilitzada en un procés químic de manera que minimitzi el potencial d'accidents químics, incloent fuites, explosions i incendis.

Tot i que en general (com es mostra a la figura 2), la indústria química és cada cop més sensible als perjudicis mediambientals que pot causar-ne la seva activitat, a les últimes dècades són molts els casos de grans accidents on els causants van ser els productes químics en qualsevol de les seves etapes (manufactura, transport o producte acabat).

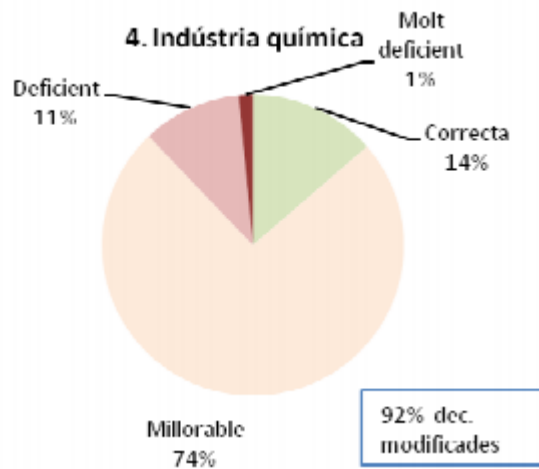


Figura 2 Deficiències PRTR-CAT registrades a la indústria química sobre un total de 132 declaracions. 2014 [6].

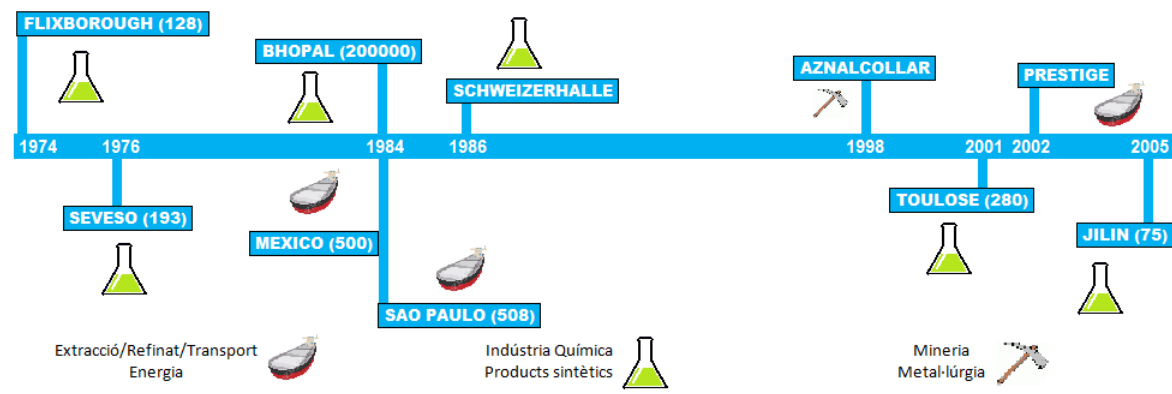


Figura 3 Incidències greus relacionades amb les substàncies químiques (entre parèntesi número d'afectats) [7].

## 3.2. Les biorefineries [8]

Una de les principals raons en el desenvolupament de la societat actual ha estat la utilització de combustibles fòssils. Però a mesura que aquests s'esgoten, s'ha de fer especial èmfasi en l'aprofitament d'altres fonts d'energia, com ara les energies renovables.

S'entén per energies renovables, aquelles que provenen d'una font d'energia que es considera inesgotable. No és el cas dels combustibles fòssils, que provenen de fonts que algun dia s'exhauriran, i per tant no són renovables. D'altra banda, es localitzen a molt poques zones del món, i que tenen una situació política inestable, per tant cada cop més seran inaccessibles econòmicament. Tanmateix, la generació d'energia a partir d'aquests, genera gran quantitat d'emissions contaminants i de gasos d'efecte hivernacle.

L'ús d'energies renovables com a alternativa comportaria reduir els efectes mediambientals i distribuir els punts de generació d'energia de manera equitativa a tot el món.

Les principals fonts renovables d'energia són: la energia eòlica, la solar, la geotèrmica i la biomassa.

Els biocombustibles, combustibles produïts a partir de biomassa, poden contribuir significativament en el sector del transport. La biomassa pot ésser transformada en combustible líquid, reemplaçant els actuals combustibles fòssils, per al seu ús en motors de combustió interna, en electricitat per a vehicles elèctrics o en hidrogen per a vehicles de cèl·lula de combustible.

### Processos Bioquímics

Els processos bioquímics inclouen principalment la fermentació alcohòlica, com a procés aerobi per produir combustibles líquids i la digestió anaeròbica, per la qual s'obté el biogàs.

El procés de fermentació s'utilitza a gran escala per a la producció d'etanol a partir de cultius com ara la canya de sucre o el blat de moro. La transformació de les lignocel·luloses és més complexa a conseqüència de la presència de molècules de cadenes llargues de polisacàrids i abans que el sucres puguin ser transformats en etanol, requereixen d'una hidròlisi enzimàtica o àcida.

La digestió anaeròbica transforma directament la matèria orgànica en biogàs, una mescla de metà i diòxid de carboni amb petites quantitats d'altres gasos, per exemple l'oxigen. La biomassa es transforma per l'acció de bacteries en un medi anaeròbic, produint un gas amb un contingut energètic aproximadament del 20-40% el poder calorífic inferior de la biomassa. La digestió és un procés provat comercialment i s'utilitza en el tractament de residus sòlids amb un elevat contingut d'humitat, superior al 80%. Generalment s'empra residus d'animals com a matèria primera en els processos de digestió, tot i que altres tipus de residus poden ser també aprofitats.

El procés d'extracció d'olis i la posterior esterificació es un procés per a la producció de biodièsel a partir de llavors oleaginoses. El procés també produeix un residu sòlid

anomenat tortell que pot ser utilitzat com a aliment per animals. L'oli de colza extret és posteriorment processat fent-lo reaccionar amb alcohol en un procés d'esterificació per obtenir biodièsel i alhora generant un subproducte que és la glicerina.

## Biorefineries

La demanda de productes derivats del petroli (per exemple els combustibles) augmenta constantment i degut al caràcter finit del petroli, el preu també augmenta en conseqüència.

Els combustibles que s'utilitzen en el sector del transport s'obtenen en unes instal·lacions industrials conegudes com refineries, on es processa el petroli per obtenir un seguit d'hidrocarburs, dels que s'extreuen combustibles com ara la gasolina o el gasoil i d'altres productes químics.

Altrament, existeix un procés anàleg a les refineries tradicionals i són les anomenades biorefineries. Son unes instal·lacions on es produeixen combustibles, energia i químics derivats de l'ús de biomassa com a matèria primera.

La definició de biorefineria varia segons la tecnologia emprada en els seus processos:

*“Una biorefineria és un concepte de planta de processament on la biomassa és convertida en una varietat de productes valuosos”*

Department of Energy (DOE)

*“Aquella instal·lació que integra processos de transformació de biomassa i equips adequats per produir combustibles, energia i químics a partir de biomassa”*

National Renewable Energy Laboratory (NREL)

El concepte de biorefineria pretén desenvolupar les instal·lacions actuals basades en cultius alimentaris per a la producció de biocombustibles a partir d'olis vegetals, sucres, gra i crear instal·lacions noves on sigui possible fraccionar i processar tota la biomassa en matèries primeres adequades per transformar-les i obtenir bioproductes com ara polímers, combustibles, calor, productes químics...

La producció en biorefineries permet substituir una part del consum de combustibles fòssils pel de biocombustibles de primera generació como el biodièsel o per biocombustibles de segona generació com l'etanol i l'etil-terbutil-eter de biomassa lignocel·lulòsica, biocombustibles Fischer-Tropsch, biohidrogen... que estan sent investigats actualment.

Existeixen diversos conceptes la classificació dels quals es basa en funció a:

- Matèria primera utilitzada: Biorefineria Verda, Biorefineria de Cultiu Complet, Biorefineria Lignocel·lulòsica, Biorefineria Marina
- Tipus de tecnologia: Biorefineria termoquímica, Biorefineria Biològica
- Avenç de la tecnologia: Biorefineria de primera o segona generació
- Productes generats: Plataforma Syngas

Els biocombustibles líquids actuals inclouen el bioetanol o el biodièsel entre d'altres. A partir dels grans oleaginosos com ara la llavor de gira-sol o de colza es produeix el biodièsel, en canvi per produir bioetanol són necessaris cultius amb alt contingut de sucres com la remolatxa o la canya de sucre.

TIPUS	BIOMASSA UTILITZADA	PRODUCTES OBTINGUTS	TECNOLOGIES UTILITZADES	ESTAT TECNOLÒGIC
<b>Biorefineria Verda</b>	Biomassa humida: pastura i cultius verds	-Combustibles -Productes químics -Materials -Polímers	- Pretractament - Prensat - Fraccionat - Separació - Digestió	Planta pilot (en R+D)
<b>Biorefineria de Cultiu Complet</b>	Cultius complets: blat, blat de moro, sègol	-Combustibles -Productes químics -Materials -Polímers	- Mòlta seca o humida - Conversió bioquímica	Planta pilot
<b>Biorefineria Lignocel·lulòsica</b>	- Fusta - Residus agrícoles - Cultius energètics - Residus municipals	-Combustibles -Productes químics -Materials -Polímers	- Pretractament - Hidròlisi química i enzimàtica - Fermentació - Separació	R+D Planta pilot
<b>Biorefineria de dues plataformes</b>	Tot tipus de biomassa	-Combustibles -Productes químics -Materials -Polímers	- Plataforma de sucre - Plataforma de gas de síntesis	Planta pilot
<b>Biorefineria Marina</b>	Biomassa aquàtica: microalgues i macroalgues	-Combustibles -Productes químics -Materials -Polímers	- Conversió termoquímica - Torrefacció - Piròlisi - Gasificació - Separació de productes - Síntesi catalítica	R+D Planta pilot

Taula 1

Taula resum dels diferents tipus de biorefineries.

### 3.3. Els biopolímers [9]

#### 3.3.1. Història dels biopolímers

Els biopolímers són biomacromolècules presents als éssers vius. Tradicionalment, la definició més acceptada considerava els biopolímers materials polimèrics o macromoleculars sintetitzats pels éssers vius. Amb la introducció de noves disciplines mèdiques, com ara la medicina regenerativa, també s'inclou com a biopolímers materials sintètics amb la particularitat de ser biocompatibles amb els éssers vius (generalment l'esser humà).

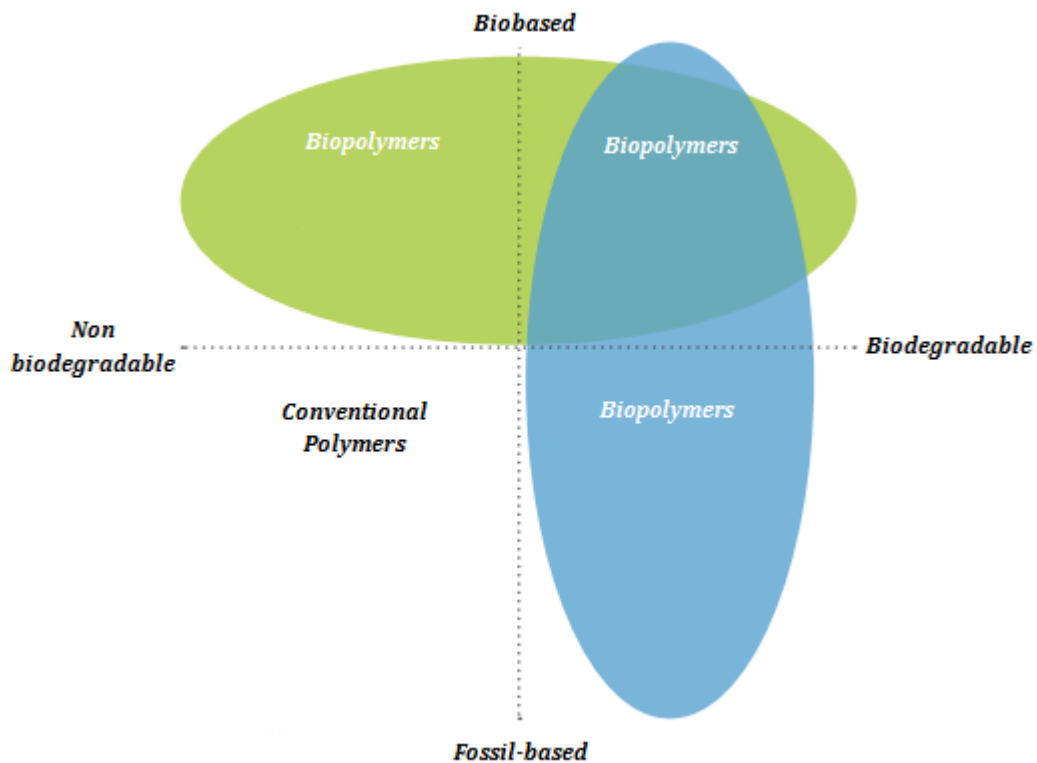


Figura 4 Esquema típus de biopolímers [10].

La seva estructura molecular està composta per unitats repetitives de sacàrids, àcids nucleics o aminoàcids i a vegades de diverses cadenes secundàries que contribueixen a les seves funcionalitats.

Al llarg de la història, els biopolímers s'han utilitzat principalment per l'ésser humà com a aliment o per a la fabricació de roba i mobles. Des de la Revolució Industrial, els combustibles fòssils com el petroli han estat la major font de desenvolupament i de fabricació de gairebé tots els productes comercials, com ara els plàstics, que a l'actualitat s'utilitzen a gran escala. Malgrat això, aquests combustibles no són recursos il·limitats, i les preocupacions ambientals sobre l'ús dels mateixos cada cop són més considerades. Per tant, s'ha d'actuar d'una manera sostenible, el que significa que els recursos han de ser consumits a un ritme tal que puguin ser restaurats pels cicles naturals del nostre planeta.



Així és que, avui en dia, la naturalesa renovable de biopolímers els porta a un renaixement i un nou interès. En els últims 20 anys, aquest interès en productes sostenibles ha impulsat el desenvolupament de nous biopolímers a partir de matèries primeres renovables. Malgrat això, els biopolímers han de competir amb polímers derivats de combustibles fòssils no només a causa de les seves propietats funcionals, sinó també en termes de cost: els biopolímers són competitius quan el preu del petroli és alt i el preu de les matèries primeres, com ara el midó de blat de moro, és baix.

Els biopolímers tenen un ampli ventall de possibilitats, per exemple, la indústria alimentària, la farmacèutica o productes electrònics entre d'altres.

Actualment, els biopolímers encara representen una petita part, tot i això, diversos factors interns i externs indiquen un creixement d'aquests:

- **Factors Interns**

- Propietats tècniques i funcionalitat molt avançades
- Potencial de reducció de costos a través d'economia d'escala
- Noves opcions de reciclatge, rentables per a productes biodegradables

- **Factors externs**

- Alta acceptació per part dels consumidors
- Preocupació creixent de la societat en vers al canvi climàtic
- Augment del preu dels recursos tradicionals
- Dependència de la societat sobre els recursos fòssils

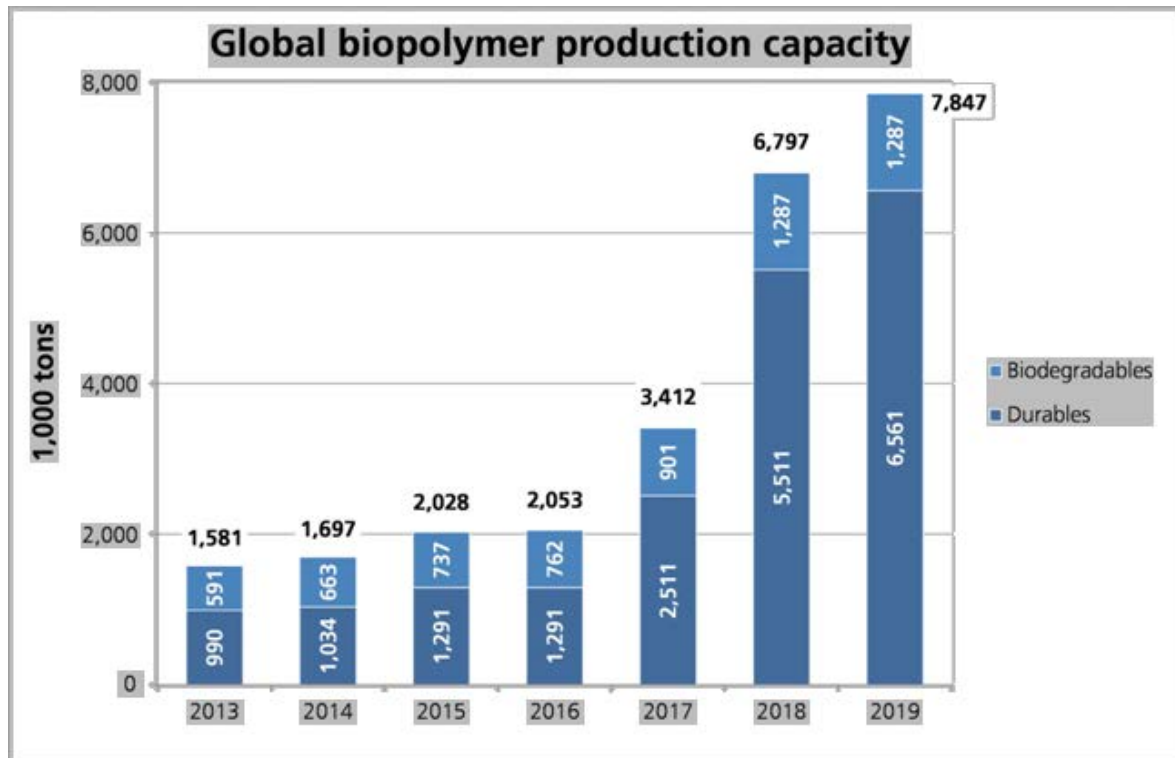


Figura 5 Dades sobre la previsió de la capacitat de producció a nivell mundial de biopolímers [11].

Amb l'actual augment de materials, aplicacions i productes, el nombre de fabricants, manipuladors i usuaris finals està en constant augment. S'han invertit importants quantitats en l'àmbit de la producció i del màrqueting per guiar i acompanyar aquesta evolució.

D'altra banda, el cost de la investigació i desenvolupament suposa una gran part de la inversió feta en els biopolímers, això té un fort impacte en els preus dels materials i els productes. No obstant, els preus han sofert una rebaixa a l'última dècada amb l'augment de la demanda, i en conseqüència, del volum de biopolímers al mercat. Així doncs, es podria suposar que en un futur pròxim, el preu serà comparable al dels polímers convencionals derivats de fonts no renovables.

### Avantatges dels productes fets a partir de biopolímers

La principal aportació dels biopolímers és la reducció de la dependència envers el recursos fòssils limitats (per exemple el petroli), que en les pròximes dècades s'encariran considerablement. Paulatinament, les fonts de recursos renovables substituiran les fonts de recursos no renovables.

Contribueixen notablement a la reducció d'emissions de gasos d'efecte hivernacle.

Un altre important avantatge es que poden “tancar el cicle” i augmentar la eficiència dels recursos. Es pot plantejar la qüestió de dues formes diferents:

- Utilitzar fonts d'energia renovables per crear productes fets a partir de bioplàstics, reciclar aquests productes diverses vegades i recuperar l'energia renovable al final del cicle de vida del producte.
- Utilitzar fonts d'energia renovables per crear productes fets a partir de biopolímers, reciclar-los orgànicament (compostatge) al final de la seva vida útil, creant així biomassa/humus amb cert valor. Aquest nou producte resultant afavoreix el creixement d'altres organismes (plantes principalment), tancant així el cicle.

En definitiva, tot sembla apuntar que l'ús de biopolímers pot contribuir a una societat més sostenible però la implantació dels biopolímers al mercat encara és en fase inicial i seran necessaris uns quants anys fins a que n'esdevinguin una part prou important.

### 3.3.2. Obtenció de biopolímers

A grans trets, existeixen dos tipus de biopolímers: aquells que són produïts de forma natural a la natura (les proteïnes o els hidrats de carboni) i aquells que s'obtenen mitjançant polimerització de recursos renovables. D'aquests, la gran majoria del biopolímers provenen de la biomassa, com és el cas del polisacàrids que s'obtenen a partir de la cel·lulosa i de les proteïnes del col·lagen o la llet, d'altres també poden ser produïts a partir de biomonòmers utilitzant processos químics convencionals, per exemple l'àcid polilàctic; o directament de microorganismes (genèticament modificats o no), com ara els polihidroxialcanoats.

La manipulació genètica de microorganismes té un gran potencial per a la producció biotecnològica de biopolímers amb propietats idònies per a aplicacions mèdiques de gran valor com poden ser l'administració de fàrmacs o l'enginyeria de teixits.

### 3.3.3. Terme d'innovació

Els biopolímers s'han convertit el nou pal de paller de la química macromolecular a l'última dècada. Aquest fet es fonamenta principalment a l'aparició de noves tècniques de polimerització com ara la polimerització per radicals controlada (CRP) i a la química click (generar substàncies de forma ràpida i fiable).

La utilització d'aquestes alternatives ha permès un molt bon control de l'arquitectura macromolecular, la distribució de massa molar, i la funcionalitat de les macromolècules. Gràcies a aquestes tècniques els copolímers en bloc són avui dia de fàcil accés, fent-ne possible l'estudi.

Les característiques específiques dels copolímers en bloc en termes de bioactivitat, biocompatibilitat i biodegradabilitat, permeten l'aplicació a la farmacèutica, on es fan servir els auto-acoblaments (polimerosomes, microgels, etc.) com a sistemes d'administració de fàrmacs amb multitud de possibilitats.

En conjunt, caldria dir que els copolímers en bloc amb base biopolimèrica són força prometedors. A l'actualitat part dels esforços es centren en les aplicacions al camp de l'electrònica, on productes amb periodicitat de tan sols 5nm s'han aconseguit reproduir.

### 3.3.4. Tipus de biopolímers [12]

#### ➤ CEL·LULOSA

La cel·lulosa és un biopolímer compost exclusivament per molècules de  $\beta$ -glucosa. La cel·lulosa forma la major part de la biomassa terrestre, el que la converteix en la biomolècula més abundant a la natura.

Tot i que la cel·lulosa, ja es coneixia i s'utilitzava des de l'antiguitat, no va ser fins el 1838, quan el químic francès Anselme Payen la va aïllar a partir de matèria vegetal i en va determinar la fórmula química.

Des de aleshores, han estat diversos els polímers produïts amb base cel·lulòsica. El 1870, la companyia Hyatt Manufacturing va desenvolupar el primer termoplàstic, el cel·luloide. Després, a la dècada de 1890 es va implementar la producció del raió (amb propietats similars a les de la seda) i el 1912 es va inventar la cel·lofana.



Figura 6 Fil de raió [12].

### ➤ POLIHIDROXIALCANOATS (PHA)

Els Polihidroxicanoats o PHA són polièsters lineals produïts a la natura per l'acció de bacteries per fermentació de sucres o lípids. Aquestes bacteries els produeixen com a mecanisme d'emmagatzemament de carboni i energia.

Entre els polihidroxicanoats més comuns es troben el PHB (àcid polihidroxibutíric), el PGA (àcid poliglicòlic) o el PLA.

El poli(àcid làctic) (PLA) és un polímer obtingut a partir de midó de blat de moro, per mitjà de la fermentació de l'àcid làctic. Després de la fermentació, l'àcid làctic se sotmet a un procés de polimerització per formar el poli(àcid làctic), bioplàstic més conegut com a PLA.

L'estructura molecular del PLA li confereixen seguit d'avantatges molt interessants. Per exemple, les seves propietats mecàniques s'assemblen a les del PET i PS. És un material que pot imprimir-se sense tractament superficial. Presenta una termosoldabilitat a temperatures inferiors a les de les poliolefines i una alta transparència. És resistent als productes aquosos i als greixos, i a més a més, el seu processat és similar al de les poliolefines (extrusió, injecció i termoconformació).

Avui dia és freqüent trobar en el mercat una gran quantitat d'envasos com a safates, ampolles o bosses flexibles, fabricades a partir de PLA.



Figura 7 Envasos fabricats amb PLA [13].

### ➤ ÀCID HIALURONIC

Els mucopolisacàrids o glicosaminoglicans (GAGs), són polímers lineals de polisacàrids de repetició formats per residus de disacàrids. Aquesta família de carbohidrats és essencial per a la majoria d'espècies animals. Els GAGs formen un component important del teixit connectiu. Les cadenes de GAG poden unir-se covalentment amb una proteïna per formar proteoglicans. Alguns exemples inclouen l'heparina, o l'àcid hialurònic.

L'àcid hialurònic o hialuronat és un GAG aniònic i no sulfatat àmpliament distribuït pels teixits connectiu, epitelial i neuronal.

L'estructura química de l'àcid hialurònic va ser determinada entorn 1950 al laboratori de Karl Meyer. L'àcid hialurònic és un polímer de disacàrids, els quals estan compostos per

àcid D-glucurònic i D-N-acetilglucosamina. El pes molecular mitjà al líquid sinovial humà oscil·la entre 3 i 4 milions Da.

A l'actualitat, gràcies al paper de l'àcid hialurònic, entre d'altres, en el processos inflamatoris, la migració cel·lular o la reepitelització; n'és molt freqüent l'ús en aplicacions mèdiques però sobretot a la indústria cosmètica.

### ➤ ÀCID POLIGLUTÀMIC [14]

L'àcid poliglutàmic (PGA), és un biopolímer lineal, polimeritzat a partir de l'àcid glutàmic mitjançant enllaç peptídic. El  $\alpha$ -PGA es sintetitza químicament, en canvi el  $\gamma$ -PGA es pot sintetitzar per fermentació mitjançant bacils, per exemple *Bacillus subtilis*.

La funció fisiològica del  $\gamma$ -PGA depèn de l'organisme productor i de les condicions ambientals que l'envolten. Pot servir com a font de glutamat en condicions de falta de nutrients i alhora pot ajudar a la supervivència del productor si aquest l'allibera al medi. També s'ha observat que la seva presència pot concedir una major virulència a organismes patògens.

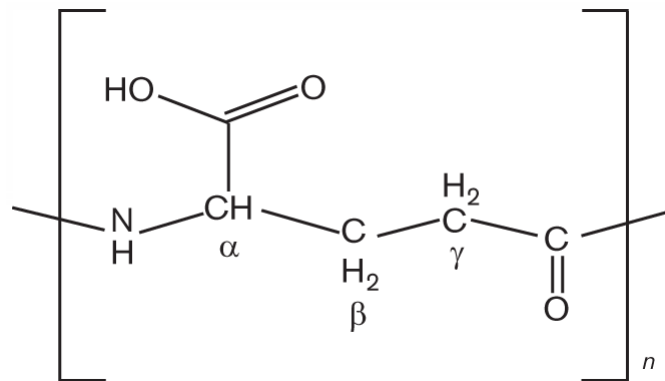


Figura 8 Estructura química de l'àcid poli- $\gamma$ -glutàmic [14].

A l'actualitat existeixen una gran varietat d'aplicacions per al PGA, algunes de les quals han estat descobertes recentment. Alguns exemples són el tractament d'aigües residuals o la medicina regenerativa.

### 3.3.5. La poli-èpsilon-lisina [2]

La poli-èpsilon-lisina ( $\epsilon$ -PL o EPL), és un homopoliaminoàcid format per aproximadament entre 25 i 35 unitats de lisina i caracteritzat per l'enllaç peptídic entre el grup carboxil i els grups  $\epsilon$ -amino de la L-lisina. Algunes espècies de *Streptomyces* tenen la capacitat de produir  $\epsilon$ -PL, sent la bactèria *S. albulus* la més representativa i la que ha estat utilitzada majoritàriament en una gran quantitat d'estudis.

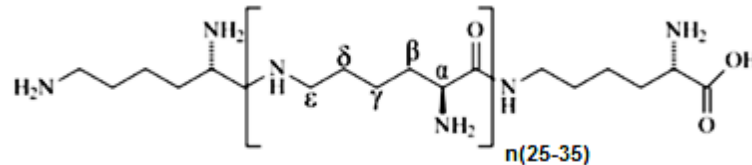


Figura 9 Representació esquemàtica de la estructura de la  $\epsilon$ -PL [2].

La  $\epsilon$ -PL va ser descoberta a la dècada de 1970. Durant un experiment d'identificació de substàncies Dragendorff-positives d'origen microbià, els investigadors Shima i Sakai (1977) van trobar la  $\epsilon$ -PL entre els materials presents al filtrat del cultiu d'actinomicets aïllats del sòl. L'actinomicet va ser identificat com a *Streptomyces albulus*, i la substància Dragendorff-positiva va ser verificada com a un homo-poli-aminoàcid consistent únicament en L-lisina.

La seguretat de la  $\epsilon$ -PL ha estat estudiada mitjançant experimentació amb petits mamífers, determinant que no existeixen cap tipus d'efectes toxicològics, neurològics, immunitaris ni per a la salut embrionària durant dues generacions.

#### Estructura química

La  $\epsilon$ -PL produïda per *S. albulus* conté entre 25 i 35 residus de L-lisina, i la producció de molècules de diversa longitud ( $n=8-36$ ) ha estat recentment provada en diferents bacteris *Streptomyces*. La  $\epsilon$ -PL està caracteritzada per la seva estructura primària i fins ara, no s'ha identificat cap tipus de ramificació.

La seva solubilitat a l'aigua és alta, i el seu punt isoelèctric per entre 25 i 35 residus és al voltant de pH 9. Tampoc s'observa cap tipus de degradació després de bullir-la a 100°C durant 30 min ni tampoc després d'autoclau.

El mètode més habitual per determinar-ne el pes molecular és la cromatografia líquida d'alta eficiència (HPLC), un mètode costós però alhora necessari en l'estudi de les propietats fisiològiques i biològiques de la  $\epsilon$ -PL. La determinació d'un pes molecular definitiu és altament complicada perquè no es disposa del polímer a nivell comercial, i es per aquest motiu que la concentració s'expressa habitualment a tots els estudis en mg/mL o ppm.

## Funció fisiològica

La funció fisiològica de la producció de  $\epsilon$ -PL a les espècies productores és un misteri. Els efectes sobre el creixement microbià han estat avaluats i s'ha trobat que la  $\epsilon$ -PL compta amb una gran capacitat antimicrobiana i contra bacteriòfags, tal i com van certificar els estudis de Shima (1984) i Sakai (1982), i la concentració mínima inhibidora (MIC) pel creixement de gran quantitat de bactèries es troba per sota de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el cas del fongs la MIC és superior, però inferior en relació a d'altres productes semblants.

El mecanisme d'inhibició del creixement bacterià és el d'adsorció electrostàtica de la  $\epsilon$ -PL a la superfície cel·lular, gràcies a les seves propietats policatiòniques i conduint a una destrucció de la membrana exterior o una distribució anormal del citoplasma

## Aplicacions

La principal aplicació de la  $\epsilon$ -PL ha estat centrada en l'ús com a additiu alimentari al Japó, Corea i els Estats Units, i encara que l'adició en grans quantitats resulta en un gust amarg, les seves grans propietats antimicrobianes comporten que la quantitats requerides són de baixa concentració. També mostra gran capacitat de sinèrgia quan és aplicada conjuntament amb d'altres additius.

Un altre camp d'aplicació de la  $\epsilon$ -PL va ser desenvolupat per Kuraray Co., Ltd (2001). En aquesta, els grups amino de la  $\epsilon$ -PL són utilitzats en la síntesi d'hidrogels. Aquestes són utilitzades principalment a l'agricultura, el processat alimentari i la medicina.

Camp d'aplicació	Exemples
Indústria alimentària	Conservant alimentari Productes dietètics
Indústria mèdica	Administració de fàrmacs Lipopolisacàrids
Altres aplicacions	Hidrogels Bioelectrònica

Taula 2

Taula d'aplicacions de la poli-èpsilon-lisina [2].



En conclusió, la  $\epsilon$ -PL és avui dia produïda industrialment i cada cop són més els estudis per trobar nous camps d'aplicació. Les seves extraordinàries propietats fisicoquímiques com a compost policatiónic, així com la seva alta activitat antimicrobiana, la introduiran inevitablement en altres camps d'aplicació.

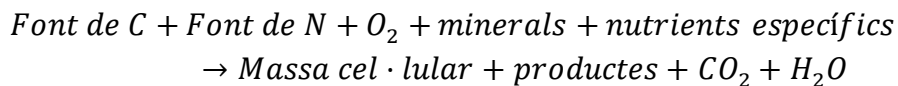
Aquesta situació podria desembocar en un desproveïment del producte, ja que el sistema actual de producció podria resultar inadequat. En aquest sentit, tot i que el mecanisme de la seva biosíntesi així com els enzims involucrats són encara desconeguts, en els últims anys s'han redoblat els esforços, obtenint alguns detalls i pistes que de ben segur permetran dissenyar un nou procés productiu més eficient en un futur no molt llunyà.



## 4. Reaccions per fermentació [1]

Un procés de creixement cel·lular implica el consum de substrats que subministren la energia i la matèria primera necessària per a la síntesi del material cel·lular i altres productes del metabolisme. Des del punt de vista macroscòpic, requereix que el microentorn contingui tots aquells elements necessaris per a la formació del material cel·lular addicional i que, a més, la energia lliure dels substrats consumits sigui superior a la energia lliure de les cèl·lules o productes formats. Ha de complir-se, per altra part, que tots es elements subministrats com a nutrients siguin presents en una forma compatible amb el mecanisme enzimàtic de la cèl·lula.

El creixement cel·lular obeeix les lleis de la conservació de la massa. Els àtoms d'oxigen, nitrogen, carboni i els altres elements es reordenen en els processos metabòlics de la cèl·lula de manera que la quantitat total incorporada coincideix amb la desapareguda de l'entorn. Es compleix que la quantitat dels productes metabòlics formats o de calor generada pel creixement cel·lular, és proporcional a la quantitat consumida d'algun dels substrats o a la quantitat formada d'algun producte. Totes aquestes propietats fan factible el plantejament de balanç de matèria i energia als processos de creixement cel·lular, expressats de forma general com a:



### 4.1. Creixement cel·lular, consum de substrats i obtenció de productes

Tal com s'ha dit, el procés de creixement cel·lular, que es produeix a partir del consum de determinats substrats i que comporta la formació d'un seguit de productes, és molt complex, ja que és el resultat de la interacció entre una població cel·lular i el medi ambient en el que es troba.

La cèl·lula té a més a més capacitat d'adaptació a canvis en la composició del medi ambient, i a llarg del cultiu poden succeir mutacions o algun tipus de pressió selectiva que provoqui canvis en les característiques genètiques de la cèl·lula. La inestabilitat cel·lular també és un fenomen que pot ocórrer. Tanmateix cal tenir en compte que en el transcurs de les diferents fases del cicle cel·lular, la cèl·lula varia l'activitat metabòlica, a més en microorganismes no unicel·lulars, com aquells que desenvolupen micelis, la morfologia i mida en varien considerablement durant el creixement. Un model de creixement cinètic que contempli tots els aspectes anomenats, entre d'altres possibles, seria d'una complexitat elevada. En definitiva, la solució escollida és la d'efectuar un seguit de supòsits que permetin obtenir una representació útil de la cinètica de creixement d'una població cel·lular. La complexitat dels models obtinguts dependrà del grau d'aproximació adoptat.

Si es treballa amb un reactor continu de tanc agitat es manté un cabal constant d'entrada i sortida, i la mescla del reactor fa que les concentracions a l'interior siguin homogènies i iguals al corrent de sortida. Fixades unes determinades condicions d'operació, la població cel·lular evolucionarà cap a un determinat estat estacionari.

## 4.2. Modelització de sistemes bioquímics

El creixement microbià es un procés complicat de modelar a conseqüència de les múltiples interaccions entre les cèl·lules i el medi, i a la gran quantitat de reaccions bioquímiques que hi intervenen en l'activitat cel·lular. Diversos models conceptuals i matemàtics s'han formulat amb l'objectiu d'explicar i replicar el comportament que mostren els sistemes biològics. Aquests models s'han classificat segons les simplificacions implementades respecte a la estructura de les cèl·lules o a la distribució de la població cel·lular. La classificació més habitual inclou models no estructurats, estructurats i segregats, no segregats.

	No estructurat	Estructurat
No segregat	Un sol component Descripció mitjana de les cèl·lules <b>CAS MÉS IDEAL</b>	Més d'un component Descripció mitjana de les cèl·lules
Segregat	Un sol component Població cel·lular homogènia	Més d'un component Població cel·lular heterogènia cèl·lules tractades individualment <b>CAS REAL</b>

Taula 3 Diferents graus d'aproximació en el plantejament de models cinètics per descriure el creixement cel·lular [1].

A aquest projecte, es treballaran models de tipus no estructurat i no segregat, és a dir, les cèl·lules es consideren totes iguals en mitjana i des d'un punt de vista cinètic es tracten com si fossin un component més del medi, sense definir-se'n cap estructura interna. Tot i que les simplificacions dutes a terme són considerables, l'aplicació d'aquests models permet obtenir unes prediccions prou bones del comportament de gran quantitat de sistemes. En cas que les prediccions no fossin prou acurades, seria necessari augmentar

la complexitat del model. En conjunt, el model s'ha d'entendre com a una interpretació d'una realitat molt més complexa. S'ha tenir clar que l'augment de la complexitat del model comporta un augment del nombre de paràmetres a determinar i que la fiabilitat del model, es troba lligada amb el grau de precisió amb que es pugui realitzar.

Seguidament es detallen els trets característics dels diferents models descrits a la taula anterior.

#### **4.2.1. Models No Estructurats**

Els models no estructurats són el més simples a l'hora de descriure el creixement microbià. En aquest s'assumeix que les cèl·lules són una entitat en solució i que aquesta interactua amb l'ambient. No se'n reconeixen cap tipus d'estructures internes de les cèl·lules, i la diversitat poblacional es considera menyspreable. La massa cel·lular es descriu amb una sola variable, la qual correspon a la concentració de biomassa total.

La expressió més habitual és l'equació de Monod. La mateixa, presenta bons resultats per a un gran nombre de situacions d'estat estable. Malgrat això, l'expressió no ajusta les dades de tots el processos de fermentació, motiu pel qual alguns autors han ajustat l'equació per millorar-ne l'ajust en casos particulars.

A més a més, l'equació de Monod no aproxima bé en presència d'inhibició per substrat, producte o ambdós, per tant s'han formulat models que incorporen cinètiques que contemplin aquesta possibilitat. Es per això que correlacions de tipus lineal, exponencial, hiperbòlic i parabòlic s'han proposat en base a les observacions experimentals, i s'han pogut provar en diferents estudis amb bons resultats [15].

Un altre tipus de model no estructurat és aquell que inclou el procés de manteniment. Aquest considera dues situacions a través de les quals el substrat es consumeix: una reacció on es converteix en biomassa, i una altra on s'utilitza per al manteniment de la cèl·lula independent del procés de creixement. Al igual que en els altres models no estructurats, la biomassa es descrita per una sola variable. Aquest model recrea bé els resultats de molts processos de fermentació [16].

#### **4.2.2. Models Estructurats**

Els models estructurats si que consideren l'estructura de la biomassa, i aquesta es descriu amb més d'una variable. Els models estructurats es poden classificar en simples o mecanicistes.

##### **Models estructurats simples:**

Incorporen qualitativament alguns mecanismes bàsics del comportament cel·lular. Aquests tenen una capacitat de predicció més elevada que els models no estructurats. D'aquesta manera es fa possible descriure els processos de creixement a diferents condicions d'operació amb el mateix grup de paràmetres, i així es poden aprofitar per optimitzar el procés. Les components de la biomassa d'aquests models, s'ajunten en algunes variables clau que són representatives del comportament cel·lular. L'activitat microbiana és funció de variables abiòtiques i de la composició cel·lular. L'activitat

microbiana depèn de les condicions ambientals que el cultiu ha experimentat amb anterioritat. Els components inclosos en el model representen l'agrupament de diferents enzims, metabòlits o altres components. Les reaccions considerades són empíriques perquè no representen conversió entre les components reals. Les cinètiques per a les reaccions individuals usualment es descriuen amb expressions empíriques tal que les dades experimentals s'ajusten amb pocs paràmetres.

Expressions com la de Monod són utilitzades perquè resumeix algunes característiques fonamentals de la majoria de les reaccions cel·lulars. Malgrat la naturalesa empírica dels models, es basen en mecanismes cel·lulars ben fonamentats, i poden simular acuradament certes característiques dels experiments. Hi ha principalment dues classes de models estructurats simples: els models de compartiments i els models cibernètics.

Els **models de compartiments**, divideixen la massa cel·lular des d'un punt de vista macroscòpic, en compartiments conformats per enzims individuals i grups de macromolècules.

Els **models cibernètics** van ser formulats per Ramkrishna [17] i el seus col·laboradors amb la intenció de descriure el creixement cel·lular a múltiples substrats. La idea bàsica del model es que un enzim clau actua de "coll d'ampolla" en el creixement sobre un substrat particular. Es per això que l'enzim ha de ser sintetitzat abans de ocórrer el creixement sobre el substrat.

Amb tot, aquests models han evolucionat a etapes on la complexitat i gran quantitat de paràmetres dificulten en excés el raonament dels comportaments observats.

#### **Models Mecanicistes:**

Són un tipus de models estructurats més complexos. Són útils per estudiar per separat processos específics de les cèl·lules. Es formulen a nivell molecular, i permeten analitzar quantitativament interaccions entre diferents components del sistema.

Aquests models permeten considerar característiques pròpies de las cèl·lules individuals com es el cas de la geometria cel·lular; per inspeccionar efectes potencials sobre el transport de nutrients. A més, permeten considerar distribucions espacials dels components intracel·lulars, i deixen incloure models de trajectòries bioquímiques i models de control metabòlic.

#### **4.2.3. Models Segregats**

Els models segregats consideren que la població cel·lular és heterogènia. Les cèl·lules individuals en la població son descrites per una sola variable (massa cel·lular o edat cel·lular).

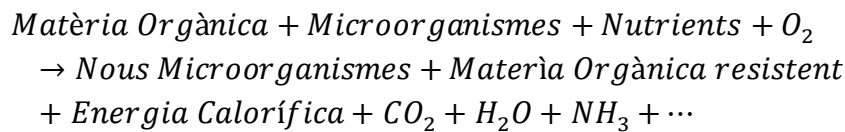
Aquests models s'utilitzen a sistemes microbians en els que s'observa que la diferenciació de les cèl·lules és primordial en a l'exercici global del cultiu, i que les cinètiques de creixement i la productivitat del cultiu són influenciades per l'aparició de més d'un tipus de cèl·lula. Es caracteritzen per formular una propietat important de les

cèl·lules, per exemple la massa cel·lular, sobre una distribució continua. Aquests models s'han aplicat per descriure el creixement de fongs filamentosos, i d'altres sistemes cel·lulars amb cultius bacterians que contenen plasmidis inestables.

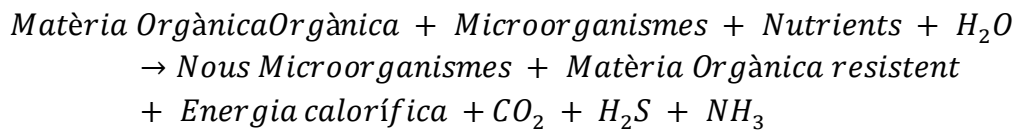
La selecció del tipus de model dependrà dels objectius del treball. Un factor de decisió molt important és la disponibilitat de dades experimentals per a les variables considerades en el model.

### 4.3. Fermentacions aeròbiques i anaeròbiques

La fermentació aeròbica de la matèria orgànica consisteix en la seva degradació en presència d'oxigen per mitjà de bactèries, produint principalment diòxid de carboni, aigua i el producte seguint la següent reacció:



La fermentació anaeròbia de la matèria orgànica, consisteix en la seva degradació en absència d'oxigen per mitjà de bactèries, produint el anomenat biogàs, una mescla de múltiples components, amb el metà com a element predominant i on s'hi troben, en diferents proporcions, una gran quantitat d'elements: CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, SH<sub>2</sub> i d'altres.

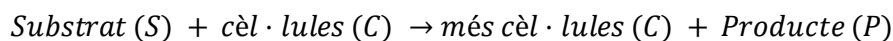


### 4.4. Cinètica de la reacció [1]

En general, un bioreactor es pot modelar com un sistema d'equacions diferencials. Si s'accepta la uniformitat (mescla perfecta) a dins del bioreactor, únicament succeeixen variacions respecte al temps, i el sistema es pot descriure amb un grup d'equacions diferencials ordinàries de primer ordre.

#### - Cinètica de creixement

Per determinar la cinètica de creixement, una de les equacions més utilitzades es l'equació de Monod, que descriu el creixement cel·lular en funció de la disponibilitat de substrat limitant, i que es pot expressar com:



$$r_x = \frac{dC}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot C}{K_S + S}$$

(1)

On:

$R_x$ : velocitat de creixement de les cèl·lules ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )

$\mu_m$ : velocitat específica màxima de creixement ( $h^{-1}$ ).

$K_s$ : constant de Monod ( $g/L$ ). També es pot expressar en funció de la velocitat específica de creixement, resultant:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

(2)

Essent  $\mu_m$  el màxim valor que pot assolir la velocitat de creixement, quan  $S \gg K_s$  i les concentracions de la resta de nutrients no han variat notablement.  $K_s$  és el valor de la concentració del nutrient limitant a la que la velocitat específica de creixement és la meitat de la màxima.

Per a valors de  $S$  inferiors a  $K_s$ , la velocitat de creixement depèn linealment de  $S$ , en canvi, per valors superiors, el valor de  $\mu$  n'és independent. Un dels inconvenients que planteja sovint la utilització d'aquesta equació és la correcta determinació del valor de  $K_s$ , atès que habitualment és molt petit.

#### - Cinètica de consum de substrat i formació de producte

Com es pot observar a les equacions anteriors, la velocitat de creixement de les cèl·lules és un procés que té lloc en paral·lel al consum de substrats i obtenció de productes, la concentració del qual té una influència directa sobre el valor de la velocitat de creixement. La relació entre tots tres processos no sempre segueix els mateixos models, i depèn de cada tipus de microorganisme.

De forma genèrica, *Gaden* establí una classificació basada en tres tipus de sistemes diferenciats:

- Tipus I: Productes associats al creixement. La formació de producte és funció del consum de substrat i en una gran part n'és proporcional.
- Tipus II: Productes parcialment associats al creixement. La formació de producte depèn només indirectament del consum de substrat.
- Tipus III: Productes no associats al creixement. La formació del producte no depèn del consum del substrat.



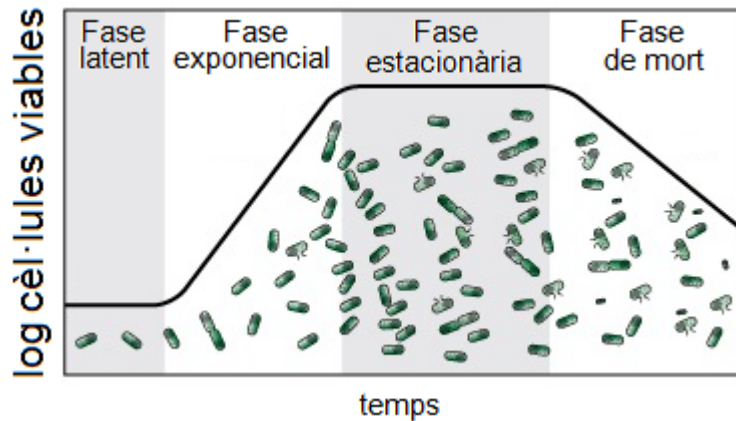


Figura 10 Fases de creixement de les cèl·lules [18].

Les expressions de velocitat de formació de productes per a cadascun dels sistemes, es basa en l'equació enunciatada per *Luedekingi Piret*:

$$r_p = \alpha \cdot r_x + \beta \cdot C = \alpha \cdot \mu \cdot C + \beta \cdot C \quad (3)$$

A partir de l'equació anterior, es pot observar que la velocitat de formació del producte depèn de dos termes, un d'associat al creixement ( $\alpha \cdot \mu \cdot C$ ) i un altre associat a la concentració de cèl·lules ( $\beta \cdot C$ ). Així doncs, per a una fermentació de tipus I, la expressió es redueix a:

$$r_p = \alpha \cdot r_x \quad (4)$$

En definitiva,  $\alpha$  coincideix amb la definició de rendiment: Producte/cèl·lules coincideix amb la definició de rendiment: Producte/cèl·lules  $Y_{p/x}$ .

Pel que fa a la relació entre creixement i consum de substrat, s'ha de valorar que el substrat és la font de carboni i també proporciona energia a les cèl·lules, el consum dedicat al manteniment de l'activitat de les cèl·lules pot ser notable, en funció de les condicions de creixement. En particular, en un cultiu en fase estacionària de creixement, el consum de substrat s'utilitza bàsicament de manteniment, amb poc creixement cel·lular, al contrari que en un creixement ràpid (en la fase exponencial d'un cultiu en discontinu) la major part del substrat consumit es destina al creixement. En general, quan s'han de valorar ambdós aspectes, s'utilitza la següent expressió per relacionar la velocitat de consum de substrat i la concentració de cèl·lules i la seva velocitat de creixement:

$$-r_s = \frac{1}{Y'_{c/s}} \cdot \mu \cdot C + m \cdot C \quad (5)$$

On:

$m$ : coeficient de manteniment i el rendiment entre les cèl·lules obtingudes i el substrat consumit.

## 4.5. Característiques cinètiques, termodinàmiques i de transferència de matèria [1]

Les reaccions biològiques presenten tot un seguit de característiques pròpies, des del punt de vista cinètic i termodinàmic, que les diferencia d'altres processos de transformació química.

- Els processos de fermentació tenen un caràcter autocatalític: els microorganismes (producte) actuen com a catalitzadors del procés.
- Són processos generalment lents.
- L'activitat específica dels catalitzadors normalment és baixa en comparació amb els catalitzadors químics.
- Tals processos depenen completament de les condicions ambientals: T, pH, oxigen,...
- La naturalesa del biocatalitzar pot veure's modificada durant el procés.
- Les entalpies de reacció són baixes, és per això que el disseny dels equips d'intercanvi de calor no hauria de suposar un gran problema.
- L'energia d'activació de la reacció té un paper transcendental, motiu pel qual en alguns rangs de temperatura, la velocitat de reacció és fortament dependent de la temperatura d'operació.
- La temperatura i pressió d'operació són moderades.
- Als processos de fermentació, habitualment es necessita una separació dels materials sòlids.

## 4.6. Bactèries productores de poli-èpsilon-lisina [19]

El coneixement sobre les espècies microbianes productores de poli-èpsilon-lisina encara són molt reduïts. S'ha observat que els grups productors de  $\epsilon$ -PL pertanyen principalment a les bactèries de la família *Streptomycetaceae*.

Els estreptomicets són una família de bacteris gram positius amb forma de bastó, que formen el gènere més gran dins de les actinobactèries.

Classificades a dins de la família es troben diversos gèneres, per exemple:

➤ *Kitasatospora*

➤ *Streptomyces*

- *S.achromogenes*
- ***S.albulus***
- *S.ambofaciens*
- *S. avermitilis*
- *S. cinnamomensis*
- *S.clavuligerus*
- *S.felleus*
- *S.griseus*
- *S.kanamyceticus*
- *S. noursei*
- *S. somaliensis*
- *S. toxytricini*
- *S. tsukubaensis*
- *S. Violaceoruber*

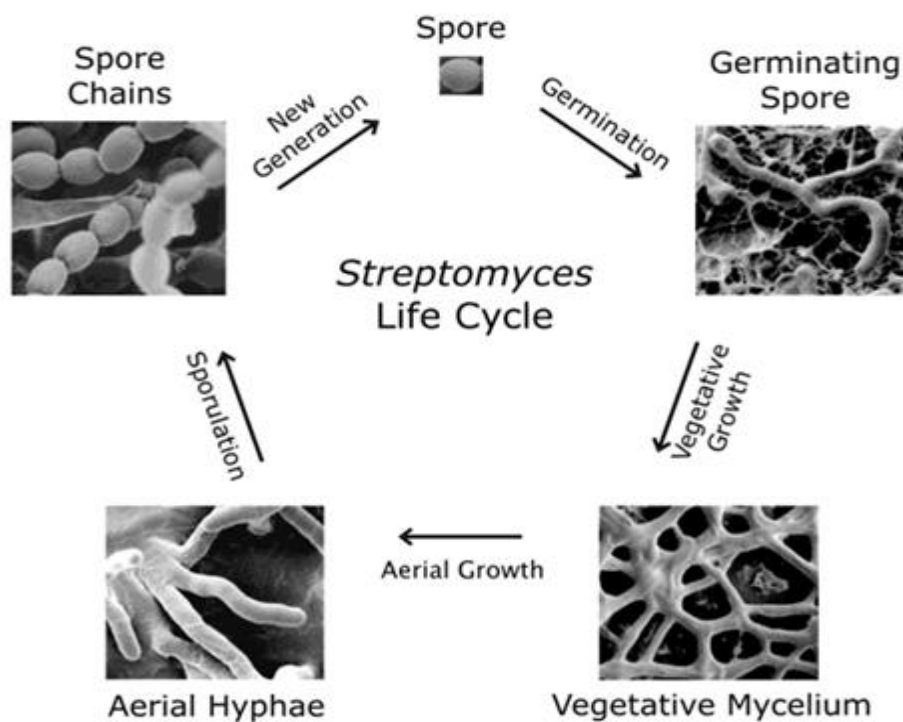


Figura 11 Cicle de vida de les bactèries *Streptomyces* [19].

El gènere de *Streptomyces* es caracteritza per la capacitat de sintetitzar nombrosos metabòlits secundaris/productes naturals, a prop del final de la fase de creixement dels microorganismes. Hi ha una gran varietat d'espècies dins d'aquest gènere, com es el cas del *Streptomyces albulus*

#### 4.6.1. *Streptomyces albulus* [20]

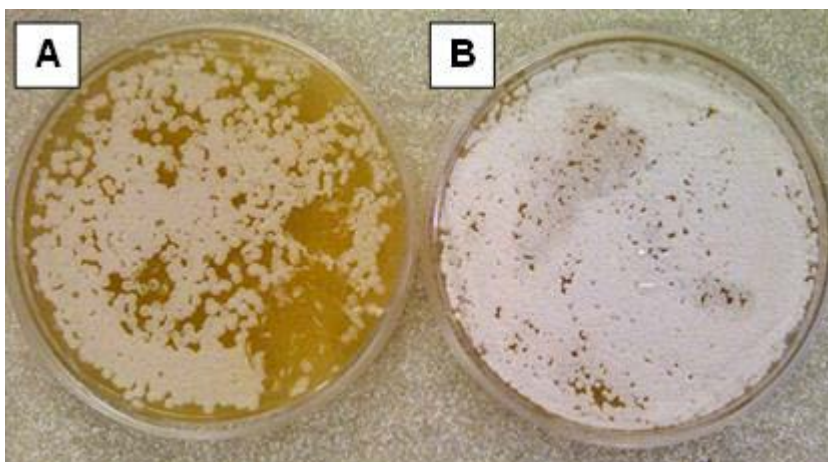


Figura 12 Creixement de *S. albulus*. (A) 3 dies després de propagació (B) 5 dies després de propagació [20].

Tal i com s'ha dit anteriorment, la espècie *S. albulus* pertany al gènere *Streptomyces*, actinobactèries filamentoses, el que implica que són grampositives. Típicament, *S. albulus* creix al sòl o al fullatge que hi cau, i tenen un metabolisme característicament complex, produint-ne nombrosos metabòlits secundaris naturals, el que les fa un recurs molt valuós per a la indústria farmacèutica.

Entre aquests productes derivats del procés metabòlic del *Streptomyces albulus*, es troben entre d'altres: la cicloheximida i la  $\epsilon$ -PL.

És per això que la espècie *Streptomyces albulus*, ha estat objecte de molts estudis a conseqüència de la seva implicació en la producció de  $\epsilon$ -PL i ha demostrat ser la principal font de bioproducció de poli-èpsilon-lisina (Hirohara 2007).

El seu creixement és més lent que el d'altres bacteris comuns al laboratori, necessitant habitualment entre 3 i 5 dies d'incubació per mostrar un creixement adequat. Estudis recents han provat que no són microorganismes patògens per als éssers vius.

Convé destacar que, aquestes bactèries també estan involucrades en la biodegradació de la  $\epsilon$ -PL. Recentment s'han pogut aïllar diversos enzims responsables del procés i els esforços actuals dels investigadors es centren en trobar mètodes d'inhibició per augmentar la producció de  $\epsilon$ -PL.

#### 4.6.2. Medis de cultiu de *Streptomyces albulus*

El medi de cultiu de la bactèria *S. albulus* ha estat objecte d'estudi amb l'objectiu de millorar la producció de  $\epsilon$ -PL.

El mètode més habitual és l'anomenat M3G. Consisteix en inocular la soca de *S. albulus* en un matràs Erlenmeyer de 500 mL que contingui 100 mL de dissolució M3G (50g/L glucosa, 10g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5g/L d'extracte de llevat; 1,36g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,8g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,04g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 30°C i sota agitació a 220 rpm durant aproximadament 8 hores.

#### 4.7. Estat de l'art de la bioproducció de poli-èpsilon-lisina [2]

Tal i com s'ha dit anteriorment, la  $\epsilon$ -PL va ser descoberta accidentalment fa més de 25 anys. Des de llavors, les condicions de producció han estat investigades per optimitzar la seva producció per a l'ús comercial.

Shima i Sakai (1977, 1981a,b) van reportar que la soca salvatge de *S. albulus* va créixer en un medi basal (50g glicerol, 10g  $(\text{NH}_4)_3\text{SO}_4$ , 5g d'extracte de llevat, 0,5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,04g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  per 1L amb adició de solució amortidora 1/50M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 6,8) i produïa 0,3 g/L de  $\epsilon$ -PL després d'un cultiu de 48h a 30°C. El procés de fermentació típic mostrava que el creixement cel·lular màxim s'aconseguia després de 20h. El posterior descens del pH era fonamental per a l'acumulació de  $\epsilon$ -PL, produïda després de 30h.

Tot seguit es mostren altres experiments realitzats per millorar la productivitat de poli-èpsilon-lisina:

##### **Shima et al. (1983)**

L'experiment es basa en un mètode de cultiu en dues passes. En primer lloc, *S. albulus* creix en un medi mineral amb un contingut de 20g/L de glicerol i 5g/L d'extracte de llevat durant 1 dia i a 30°C. Aleshores, les cèl·lules són recollides per filtració i inoculades a un medi mineral amb un contingut de 20g/L de glucosa, 20 g/L d'àcid cítric i 10g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Aquest mètode resulta molt productiu, entre 4 i 5 g/L de  $\epsilon$ -PL es poden produir en un període de 8 a 9 dies.

##### **Hiraki et al. (1998)**

Mutacions S-(2-aminoetil)-L-cisteïna(AEC) i resistents a la glicina, van ser creades a partir de la soca 346 de *S. albulus*. La producció resultant va ser 4 vegades superior amb la utilització d'un nou medi, M3G (50g glucosa, 10g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5g d'extracte de llevat; 1,36g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,8g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,04g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 30°C durant 96 h. Es va observar una caiguda de pH des de 6,8 a 4,2 en 36h, i una lenta

caiguda a 3,2 a les 96h. L'acumulació de  $\epsilon$ -PL es va incrementar significativament quan el pH era inferior a 4,2.

### Kahar et al. (2001)

El cultiu de *S. albulus* 410 va ser dut a terme en un medi M3G a un fermentador fed-batch de vas de 5L, amb control de pH. El control del pH va ser dividit en dues fases. A la primera fase, el creixement cel·lular va ser accelerat mantenint el pH per sobre de 5,0; a la segona fase, la producció de  $\epsilon$ -PL es va incrementar mantenint el pH al voltant de 4,0. Amb aquest mètode de control, es va aconseguir millorar la producció típica d'un procés fed-batch de 5,7g/L fins a 48,3g/L

En conclusió, en vista dels resultats aportats pels diferents investigadors mundials, es decideix prendre les condicions de Kahar et al. (Kahar, 2001) que consisteixen en:

- Temps de fermentació: 6 dies
- Productivitat: 40 g/L de  $\epsilon$ -PL al final de la fermentació
- Font de carboni: Glucosa. Inicialment s'aporten 50 g/L fins que, després de 72 h la concentració decau fins a 10 g/L. Posteriorment, manteniment d'aquesta concentració pel mètode fed-batch fins a les 144 h (75 g per L en total repartits en 72 h, es a dir al voltant de 1,04 g/h de realimentació o be, lots de 15 g per cada L cada 12 h).
- Medi de cultiu durant el procés fermentatiu: M3G, consistent en: 10g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5g/L d'extracte de llevat; 1,36g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,8g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,04g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- Temperatura de la bioproducció: 30°C.
- pH: Hi ha dues etapes:
  - o Etapa inicial (fins a les 72 h): El pH inicial és de 6,8 i es deixa caure lliurement fins a 4.
  - o Etapa de manteniment (72-144h): Es procedeix al manteniment del nivell d'acidesa mitjançant l'addició automàtica de NaOH (dissolució de concentració 2 mol/L).
- De les dades proporcionades per l'estudi, es poden deduir els següents paràmetres de creixement microbià:
 

o $K_s = 15 \text{ g/L}$	o $Y_{P/S} = 0,18 \text{ g/g}$
o $\mu_m = 0,075 \text{ h}^{-1}$	o $C_0 = 0,7 \text{ g/L}$
o $Y_{C/S} = 0,7 \text{ g/g}$	o $S_0 = 50 \text{ g/L}$

## 5. Introducció als bioreactors

Un bioreactor o fermentador, és un volum de control o sistema que manté un ambient propici per al creixement biològic.

En alguns casos, un bioreactor és un recipient en el que es porta a terme un procés químic que involucra organismes o substàncies bioquímicament actives derivades d'aquests organismes. Aquest procés pot ser aeròbic o anaeròbic.

Aquests bioreactors són habitualment cilíndrics, variant en dimensió des d'uns pocs mil·límetres fins a metres cúbics i són usualment fabricats en acer inoxidable.

### 5.1. Tipus de bioreactors

#### 5.1.1. BIOREACTOR DE TANC AGITAT

El bioreactor de tanc agitat és el més utilitzat a la indústria. Es pot operar de tres formes diferents: discontinu, discontinu alimentat (*fed-batch*) i continu [21].

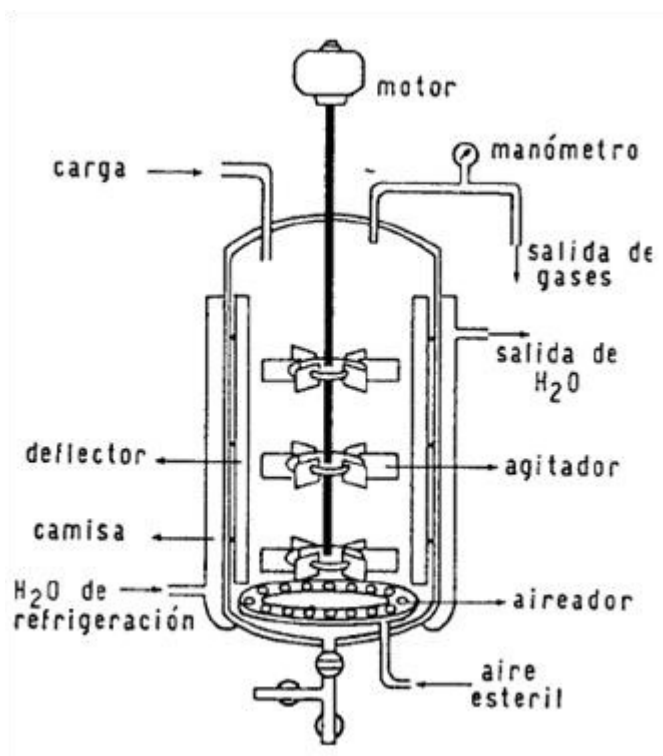


Figura 13 Bioreactor de tanc agitat [1].

- **MOTOR:** Agitador compost d'hèlixs o paletes que proporcionen l'agitació a la mescla.
- **CONDUCTOR D'ENTRADA I SORTIDA:** Font d'alimentació del substrat i sortida de producte, també poden existir sortides de gasos.
- **DEFLECTOR:** Plaques destinades a evitar la formació de vòrtexs.
- **AERACIÓ:** Dispositiu que genera un flux d'aire a dins de l'agitador per a aportar turbulència i ajudar a homogeneïtzar la mescla, alhora que proporciona oxigen al medi.
- **MANÒMETRE:** Dispositiu de regulació i lectura de la pressió interna del tanc.
- **CAMISA:** Recobriment tèrmic que ajuda a aïllar la mescla i conservar la temperatura.

L'agitador consta d'un motor al que es connecta un eix que incorpora els àleps o paletes. Hi ha una gran varietat de dissenys de paletes i normalment ocupen uns dos terços del diàmetre del reactor. L'agitador es situa a 1/3 de la base.

La majoria dels reactors discontinus utilitzen també parets deflectores, amb la funció de trencar el flux causat per la rotació de l'agitador, és a dir, la formació de vòrtexs. Aquestes poden estar fixades a la tapa o muntades a les parets laterals.

El calor generat a la reacció i l'agitació o el calor absorbit a la reacció, s'elimina o s'afegeix mitjançant una camisa o un sistema de tubs. En alguns casos, es pot controlar la temperatura per mitjà del sistema d'aeració (introduint aire més o menys calent en funció de les necessitats).

### **Bioreactor discontinu de tanc agitat**

A aquest reactor, tant el medi de fermentació com l'inòcul s'introdueixen en el sistema al començament de l'operació. Tret de l'entrada/sortida de gasos i l'adició d'antiescumants o reguladors de pH, no s'acostuma a introduir res fins la finalització del procés.

El reactor es troba uniformement mesclat, així, la concentració de tots els components és la mateixa a qualsevol punt del reactor.

Un bioreactor de tanc agitat discontinu està format per un tanc amb un agitador i un sistema integral de calefacció / refrigeració.



Les característiques principals d'aquests tancs són:

- Volum: pot variar des d'un litre fins a superar els 15.000.
- Materials: acer, acer inoxidable, vidre revestit d'acer, vidre o aliatges.
- Càrrega: Líquids i sòlids són introduïts a través de connexions a la tapa del reactor. Els vapors i gasos també s'alimenten a través de connexions a la part superior.

### Bioreactor discontinu alimentat (Fed-batch)

A aquests tipus de bioreactors, el substrat s'alimenta en càrregues successives i no es retira producte, per tant el volum del medi de reacció varia durant el procés. Aquesta metodologia d'alimentació (*fed-batch*) permet solucionar alguns problemes que presenta l'operació del reactor discontinu.

El principal avantatge que presenta és que permet controlar o alterar la concentració d'un o més nutrients o substrat en el medi de cultiu. Aquest fet pot millorar la productivitat global del procés en relació al procés discontinu.

El substrat s'afegeix a mesura que es va consumint, mantenint la concentració en uns valors que permetin assolir velocitats de reacció prou bones, aconseguint un equilibri entre l'augment de velocitat i el de concentració de substrat i disminució per efecte de la inhibició per producte.

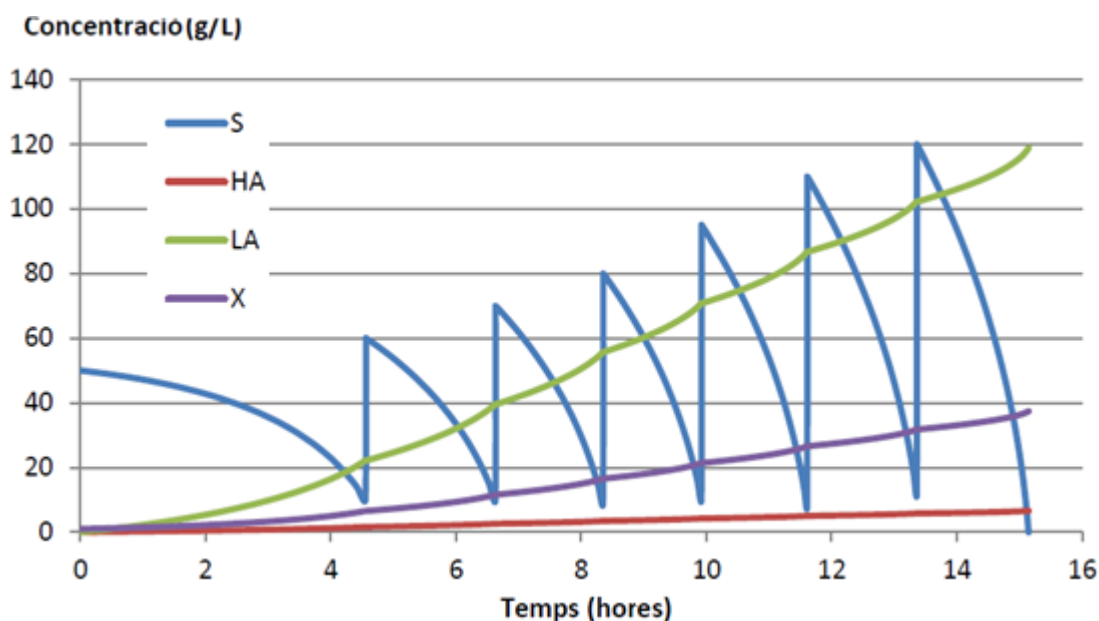


Figura 14 Dinàmica d'un procés Fed-Batch: alimentació per cicles [21].

### Bioreactor continu de tanc agitat

Els reactors continus de tanc agitat són equips cilíndrics amb un sistema d'homogeneïtzació que garanteix la mateixa composició a qualsevol punt del reactor. També són coneguts com a quimiòstats.

El procés continu implica simultàniament l'entrada i sortida de medi líquid, de manera que el volum al reactor és constant. Un dels avantatges principals d'aquest model de reactor és la reducció de costos a conseqüència de la reducció de mà d'obra i energia (major productivitat, millor control del procés).

### Bioreactor continu de tanc agitat amb recirculació cel·lular

La principal característica d'aquest bioreactor és la presència d'un sistema de separació de biomassa (decantació, centrifugació o ultrafiltració) acoblat al reactor, que permet la recirculació parcial per a augmentar la concentració cel·lular al bioreactor i, així, la productivitat volumètrica.

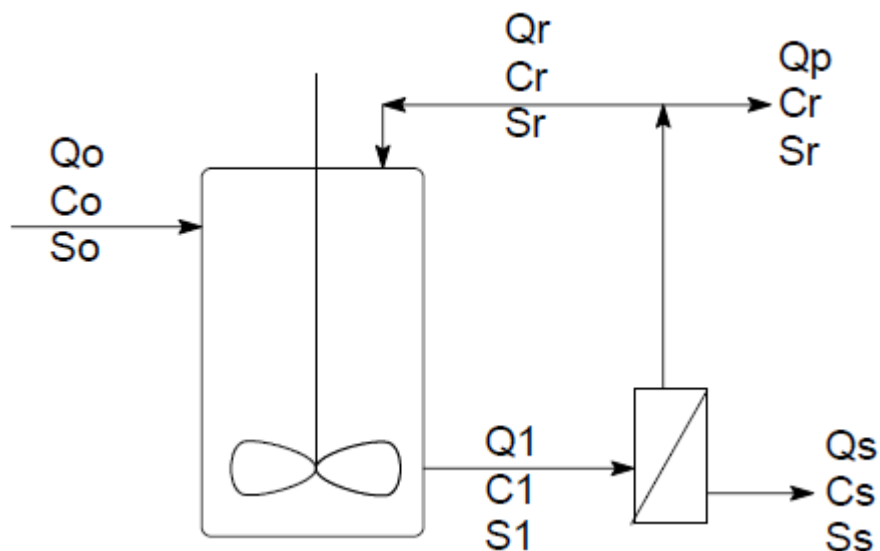


Figura 15 Esquema d'un Reactor continu de tanc agitat amb recirculació cel·lular [21].

### 5.1.2. BIOREACTOR DE COLUMNA DE BOMBOLLES

Als reactors de columna de bombolleig, la ventilació i la mescla s'assumeix mitjançant la injecció de gas, procés que requereix menys energia que l'agitació mecànica. La introducció del gas permet assolir una agitació homogènia i l'oxigenació de la mescla.

Tal i com es mostra a la figura 16, els bioreactors de columna de bombolleig poden tenir diferents configuracions:

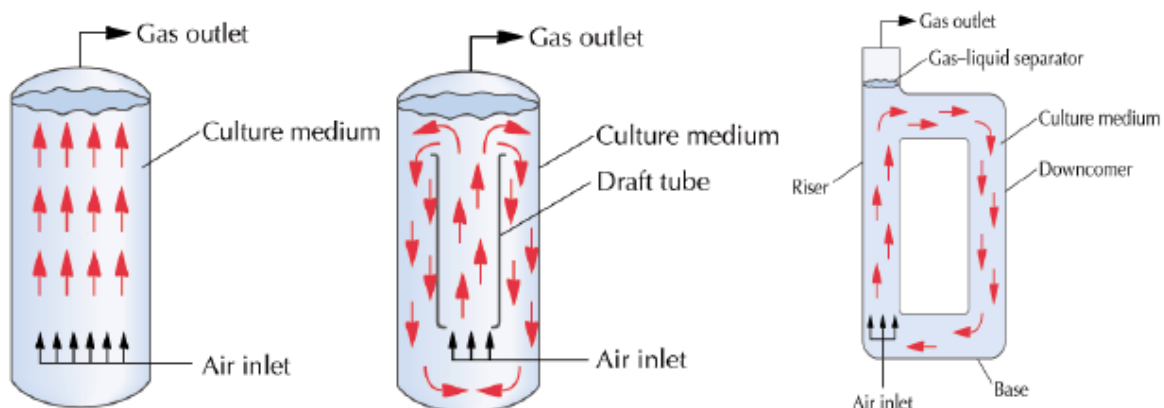


Figura 16 Diferents tipus de bioreactors de columna d'aire [21].

### 5.1.3. ALTRES TIPUS DE BIOREACTORS

#### De llit fluiditzat

No són molt corrents, a conseqüència del seu alt cost i complexitat. El microorganisme roman suspès al fermentador per l'acció del bombolleig continu,

#### De llit de degoteig

Són els més tradicionals (similar als de llit fix). El substrat es fa passar lentament per la matriu que conté el microorganisme, el que suposa la consideració d'un temps de residència a la matriu.

#### D'enzims o cèl·lules immobilitzats

Són els més innovadors. La immobilització pot efectuar-se per mitjans físics (per exemple adsorció) o químics (enllaços covalents). Permeten reutilitzar contínuament el biocatalitzador, disminuint costos. Presenten l'inconvenient que les cèl·lules poder participar en diversos processos fermentatius, augmentant la inestabilitat genètica.

## **Fotobioreactor**

Un fotobioreactor és un tanc fabricat en material transparent i que té la funció de cultivar microorganismes fotosintètics aquàtics. Està format per un receptor solar (sistema tubular) i un sistema d'impulsió (bombolleig d'aire). Aquest bioreactor pot operar en continu o en discontinu, permetent la injecció de diòxid de carboni i el control de pH i de la concentració d'oxigen dissolt en el cultiu.

## 6. Materials i equip

En l'elecció del bioreactor, i amb el propòsit d'aportar beneficis econòmics a la seva operació, s'han tingut en compte els següents objectius:

1. Alt rendiment en el producte desitjat: assolir una gran conversió (emprar completament la matèria primera) i aconseguir una alta selectivitat en el producte desitjat evitant la generació de coproductes.
2. Elevada productivitat: velocitat a la que ocorre el procés.
3. Obtenció de producte en concentració elevada: per a disminuir la complexitat i els costos de separació.

### 6.1. Elecció del bioreactor

#### 6.1.1. Vas

El reactor escollit per a dur a terme la fermentació ha estat un bioreactor de tanc agitat alimentat per lots.

#### 6.1.2. Geometria

La geometria típica d'aquests reactors és de forma cilíndrica, amb una altura aproximada a 3/2 la del diàmetre del cilindre.

El bioreactor incorporarà 4 peus que exerciran de suport vertical i li donaran una major estabilitat, prevenint possibles accidents en la manipulació.

El càlcul del volum i mesures està especificat en el punt *Paràmetres de disseny* (punt 7.1.).

#### 6.1.3. Materials

El material seleccionat és l'acer inoxidable tipus 316L, un dels més emprats en l'àmbit de la biotecnologia a causa de les seves excel·lents propietats [22].

En primer lloc té una alta càrrega de sals, el que li confereix una bona resistència a la corrosió, d'altra banda té una bona resistència (duresa), mal·leabilitat i soldabilitat. La seva composició química és Crom, Níquel i Molibdè (al 2-3%), la presència d'aquest últim no únicament millora la resistència a la corrosió, sinó que en prevé l'aparició.

Tal i com s'ha dit, té una gran resistència a l'acció corrosiva, ja sigui per picadura com per reactius químics o per atmosfera marina.

Com a avantatge extra, és un matèria de fàcil neteja i esterilització.

#### 6.1.4. Vàlvules i ports – Sistemes d'alimentació i de sortida

El bioreactor disposarà de 8 ports a la tapa superior, quatre de grans i quatre de petits. Els ports de major diàmetre són aquells per on entrarà l'alimentació, els reactius i en el cas que en algun moment fos necessària l'addició de medi, aigua o qualsevol altre element.

Així mateix compta amb un conducte per a l'entrada de l'aire (sistema d'aeració), també a la tapa del bioreactor, el qual disposa d'una vàlvula de bola per a poder regular el cabal d'aire d'entrada.

Per la seva part, els ports més petits, estan destinats a la introducció del sistemes de regulació del medi (temperatura i pH).

A la base del bioreactor, hi haurà un port de sortida del producte final, aquest disposa d'una vàlvula de bola, per a poder regular el cabal de sortida.

### 6.2. Sistema de control de temperatura

Amb l'objectiu de maximitzar el rendiment del procés, cal que el medi es mantingui en tot moment al voltant dels 30 °C. Per aquest motiu s'ha decidit la instal·lació d'un sistema format per un termòmetre, un termòstat i resistència elèctrica.

L'activació de la resistència estarà controlada per un sistema compost per un termòmetre i un termòstat. D'una banda, el termòmetre elegit és un de convencional de laboratori, digital i que és el suficientment llarg com per estar en contacte amb la dissolució.

El termòmetre escollit és el model "TH310 termòmetre digital" de la marca MILWAUKEE.



Figura 17 Termòmetre TH310 – Milwaukee [23].

D'altra banda, el termòstat que s'ha decidit instal·lar és el model "ID961" de l'empresa ELIWELL, programable, i que disposa d'una d'entrada digital universal i també d'una sortida digital de relé.

Per últim, la resistència escollida, entre moltes altres trobades al mercat, és una de la casa *Process Heating Services Ltd* model "immersion heater 30" d'1kW de potència, potència suficient per escalfar el cultiu en poc temps en relació a la durada total de la reacció. Té una llargària de 75 cm, per tant, pot quedar submergida als 500L de brou de cultiu.

### 6.3. Sistemes de control de paràmetres bioquímics: pH

El pH-metre seleccionat ha estat el model "H-Series Meters and Non-Glass Probes Data Sheet – NMR Tube pH Probe waterproof version" de l'empresa HACH, per les seves grans propietats: és altament resistent a temperatura, líquids i s'eviten possibles trencaments del cristall durant el procés de fermentació. A més a més és suficientment llarg per a estar en constant contacte amb la dissolució.



Figura 18 Sonda mesuradora de pH. HACH [24].

Tanmateix, per mantenir el pH a un valor constant és necessari l'addició periòdica d'una dissolució de NaOH (2 mols/L) mitjançant una bomba peristàtica, equips de baix cabal però d'alta precisió. Per exemple, es pot utilitzar una *EMD Millipore Pellicon™ Easy-Load Peristaltic Pump*, que la subministra *Fisher Scientific*. El controlador automàtic podria ser, per exemple, el "403U/L2 Dual Channel Low-Flow Pump"; també subministrat per la casa *Fisher Scientific*.



Figura 19 Controlador automàtic Fisher Scientific [25].





## 7. Disseny del bioreactor

El mètode principal en el disseny de bioreactors es basa en càlculs estequiomètrics, models cinètics i anàlisi o proves experimentals realitzades amb anterioritat. Així, s'especifica la concentració de substrat alimentada i la velocitat de flux d'entrada.

Pera l'anàlisi i disseny de bioreactors és necessari tenir el coneixement de la cinètica de la reacció, del balanç de matèria i, si fos necessari, del balanç d'energia.

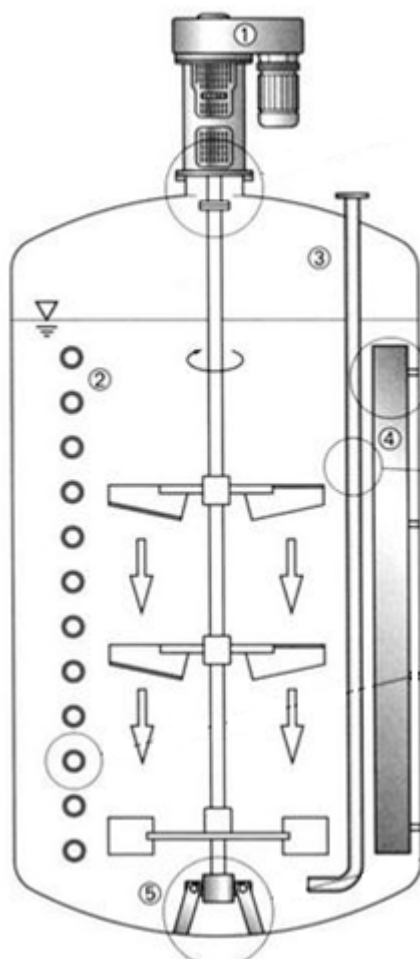
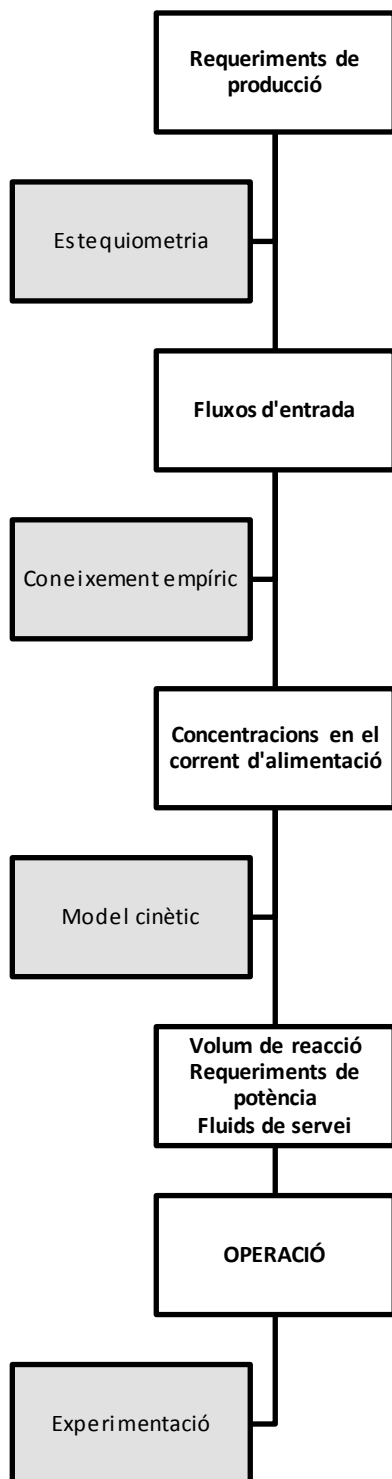


Figura 20 Esquema d'un bioreactor convencional [26].

A continuació es presenta un esquema general del mètode convencional del disseny de bioreactors.



Esquema 3 Mètode convencional de disseny de bioreactors [26].

## 7.1. Paràmetres de disseny

### 7.1.1. Càlcul de la capacitat de producció

Per poder dimensionar el bioreactor, és necessari determinar la demanda que esperem tingui aquest producte en el nostre mercat. En el nostre cas, la producció de poli-èpsilon-lisina a partir de la fermentació de la glucosa no està dimensionada a escala industrial, és per això que s'ha decidit dissenyar una planta pilot. S'ha establert una producció anual de 900 kg de  $\epsilon$ -PL l'any, un volum de producció que es troba dins dels rangs habituals per a una planta pilot.

Així mateix, s'ha determinat que la planta pilot treballarà 270 dies l'any (45 setmanes), dedicant la resta de l'any al manteniment i neteja dels sistemes de treball. Així doncs, ja es pot establir la quantitat de producte que s'obtindrà setmanalment (es considera una duració del cicle de treball de 6 dies i s'igualava una setmana):

$$P_{setmana} = 900 \frac{kg}{any} \epsilon - PL \cdot \frac{1 any}{270 dies} \cdot \frac{6 dies}{1 setmana} = 20 \frac{kg}{setmana} \epsilon - PL$$

(6)

### 7.1.2. Geomètrics

En funció de la capacitat de producció es calcularà el volum i les dimensions òptimes del bioreactor per produir 20 kg de  $\epsilon$ -PL a la setmana.

Tenint en compte que el volum útil d'un bioreactor és aproximadament un 70% del volum real d'aquest, i que el diàmetre és dos terços de l'altura, es poden calcular les dimensions del bioreactor (*Els números han estat arrodonits pera facilitar la cerca de dades i els càlculs*).

El bioreactor produirà 0,040 kg/L de poli-èpsilon-lisina per cicle de treball (6 dies), segons l'article [3] utilitzat com a referència, amb aquesta dada i establint una producció desitjada de 20 kg de  $\epsilon$ -PL per setmana:

$$20 \frac{kg}{setmana} = V \cdot 0,040 \frac{kg}{L} \rightarrow V_F = 500 L$$

(7)

$$V_u = 0,7 \cdot V_F$$

(8)

$$V_F = \frac{500 L}{0,7} = 715 L \sim 750L$$

(9)

Per tant:

$$\left\{ \begin{array}{l} V_F = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H \\ D \approx \frac{2}{3} H \end{array} \right. \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} V_F = 750 L \\ H = 1,29 m \cong 1,2 m \\ D = 0,86 m \cong 0,9 m \end{array} \right.$$

(10)

### 7.1.3. Aeració

El procés d'aeració és cabdal en les fermentacions aeròbiques. Aquest procés està caracteritzat pel coeficient de transferència d'oxigen entre la fase gas i la fase líquida.

L'oxigen ha de ser subministrat en tot moment al cultiu amb l'objectiu de mantenir una població activa, per tant, aquest oxigen ha de ser transferit des de la fase gas a la fase líquida, on podrà el microorganisme el podrà utilitzar.

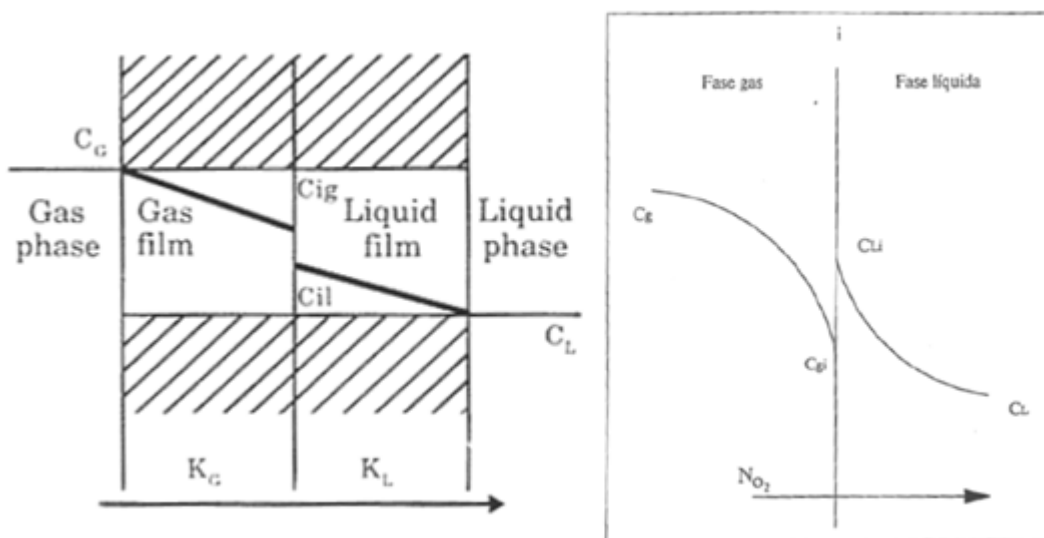


Figura 21 Esquema de transport d'oxigen des de la fase gas a la fase líquida [27].

Algunes consideracions a tenir en compte són:

- Proporcionar als microorganismes l'oxigen necessari per dur a terme el procés respiratori.
- La solubilitat del O<sub>2</sub> és baixa < 10mg/l, el que comporta una alimentació del "nutrient".

El reactor s'haurà d'alimentar amb un cabal d'oxigen suficientment gran com per a que el O<sub>2</sub> no sigui el reactiu limitant del procés. Amb un flux d'1 vvm s'assegura la bona oxigenació [28] de la biomassa i el balanç d'oxigen estarà establert i en excés.

Ara bé, en cas que el transport de O<sub>2</sub> no fos suficient, s'haurà de calcular la taxa de transferència d'oxigen, encara que d'acord a la bibliografia consultada aquesta circumstància no s'ha manifestat prèviament.

Tal i com s'ha dit, el cabal d'aeració és de 1 vvm (volum d'aire per volum de fermentador i minut), amb aquesta dada i juntament amb el volum del bioreactor definit a l'apartat anterior, es pot calcular el cabal de gas d'entrada:

$$Q_g = 1 \frac{m^3 \text{ gas}}{m^3 \text{ ferm} \cdot \text{min}} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \cdot V_F \quad (11)$$

$$\text{Així doncs: } Q_g = 1 \text{ vvm} \cdot \frac{m^3 \text{ gas}}{m^3 \text{ ferm} \cdot \text{min}} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \cdot 0,5 \text{ m}^3 = 8,33 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{s} \quad (12)$$

$$Q_g = 8,3 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{s} = 500 \frac{l}{\text{min}} \quad (13)$$

#### 7.1.4. Agitació

El procés d'agitació té una gran importància en el disseny d'un bioreactor i juntament amb l'aeració seran els encarregats d'homogeneïtzar la mescla i que la concentració dels components sigui la mateixa a qualsevol punt del bioreactor.

Per poder definir les dimensions del sistema d'agitació, és necessari saber les dimensions bàsiques del bioreactor, i un cop conegudes, a partir de la figura 22 on es representen les proporcions i relacions geomètriques estàndard per a fermentadors industrials, es podrà definir el nombre d'àleps i la dimensió del mateixos, el diàmetre de l'agitador, la seva superfície, i altres paràmetres necessaris.

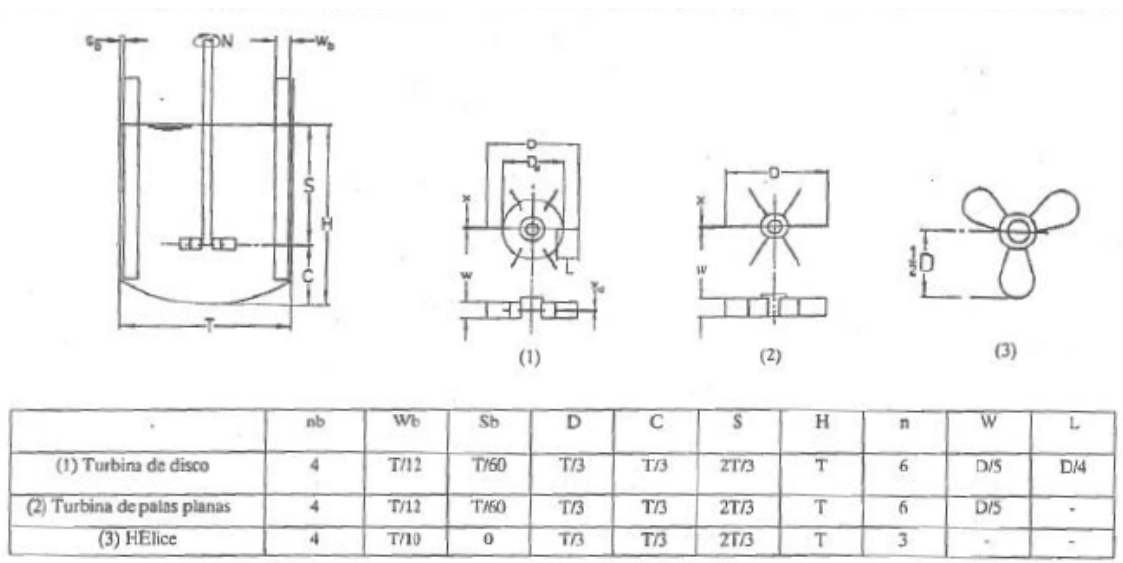


Figura 22 Esquema de les relacions i proporcions geomètriques estàndard per a fermentadors industrials [1].

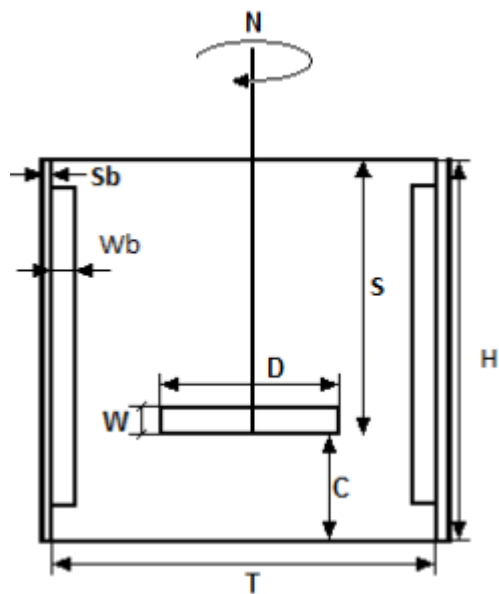


Figura 23 Esquema de la nomenclatura utilitzada per a dimensionar el reactor [1].

	Nomenclatura	Fórmula	Valor numèric
<b>Diàmetre del bioreactor</b>	T	-	0,90 m
<b>Altura del bioreactor</b>	H	-	1,2 m
<b>Número de deflectors</b>	$n_b$	-	4
<b>Deflectors</b>	$W_b$	$T/12$	0,075 m
<b>Separació paret- deflector</b>	$S_b$	$T/60$	0,015 m
<b>Diàmetre de l'agitador</b>	D	$T/3$	0,3 m
<b>Distància agitador-base del bioreactor</b>	C	$T/3$	0,3 m
<b>Longitud útil de l'agitador</b>	S	$2T/3$	0,6 m
<b>Número d'àleps</b>	n	-	6
<b>Amplada d'àlep</b>	W	$D/5$	0,06 m
<b>Longitud d'àlep</b>	L	$D/4$	0,075 m

Taula 4 Taula detallada del dimensionat dels components del sistema d'agitació [1].

A mesura que augmenta el diàmetre del sistema d'agitació (D), també ho farà la potència requerida pel sistema (P). Per aconseguir la potència i disseny òptims, hi ha dues possibilitats:

- Instal·lar diverses paletes en diàmetres descendents i distribuir-les successivament en altures equidistants a tota l'altura de la columna de fluid.
- Instal·lar diverses paletes d'igual diàmetre a altures equidistants a tota l'altura de la columna de fluid.

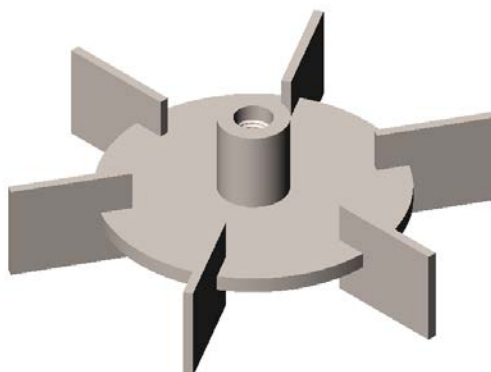


Figura 24 Pales Rushton modelitzades en el nostre disseny.

La segona opció ha estat la escollida, per la simplicitat i el menor cost: 3 paletes de 6 àleps de disc distribuïts a tota l'altura de la columna de fluid, amb una distància de 17 cm entre elles.

### 7.1.5. Introducció teòrica al càlcul del sistema d'agitació

L'agitació del sistema es defineix a partir de la relació entre la potència consumida pel sistema i les variables d'operació. La potència absorbida durant l'agitació del sistema pot representar-se mitjançant mòduls adimensionals, com és el cas del número de potència ( $N_P$ ). Aquest número de potència es pot relacionar amb mòduls adimensionals que descriuen el moviment del líquid a l'interior del tanc, com és ara el número de Reynolds.

Respecte del nostre cas, es treballa amb aeració, és a dir, introduint aire en el medi líquid, el que comporta una reducció instantània de la potència necessària per a l'agitació. La disminució és deguda principalment a que els valors de la densitat i viscositat de la fase líquida disminueixen a conseqüència de l'aparició de bombolles. Un dels paràmetres característics dels sistemes d'aeració és el *hold-up* o retenció de la fase gas ( $\varepsilon_g$ ), que es defineix com el quocient entre el volum de gas en el fermentador i el volum total (gas + líquid):

$$\varepsilon_g = \frac{V_g}{V_g + V_l} \quad (14)$$

On:

$\varepsilon_g$ : retenció de la fase gas

$V_g$ : volum de gas en el fermentador

$V_l$ : volum de líquid en el fermentador

$V_F$ : volum del fermentador

Per tant, si es suposa que el fluid és una dispersió de bombolles, el sistema es comportarà com a un líquid amb una densitat  $\rho_g$ , menor a la del líquid ( $\rho$ ), que es pot relacionar amb la següent equació:

$$\rho_g = \rho \cdot (1 - \varepsilon_g) \quad (15)$$

Així doncs, la definició del número de potència és la següent (diferent a la utilitzada a sistemes convencionals):



$$N_p = \frac{P_g}{\rho_g \cdot N^3 \cdot D^5} \quad (16)$$

$$Re = \frac{r \cdot D^2 \cdot N}{m} \quad (17)$$

On:

$N_p$ : Número de potència

$Re$ : Nombre de Reynolds

$P_g$ : Potència absorbida pel sistema airejat

$\rho_g$ : densitat aparent del líquid

$N$ : velocitat d'agitació

$D$ : diàmetre de l'impulsor

Amb l'objectiu de determinar les necessitats de potència en sistemes airejats es defineix un mòdul adimensional anomenat número d'aeració ( $N_a$ ). El valor d'aquest mòdul ens indica el grau de dispersió de les bombolles al voltant de l'impulsor.

$$N_a = \frac{Q_g}{N \cdot D^3} \quad (18)$$

On:

$Q_g$  ( $m^3/s$ ): cabal de gas

La relació entre la potència absorbida expressada amb el número de potència ( $N_p$ ) i el número d'aeració ( $N_a$ ) pot obtenir-se a partir de la gràfica representada a la Figura 25.

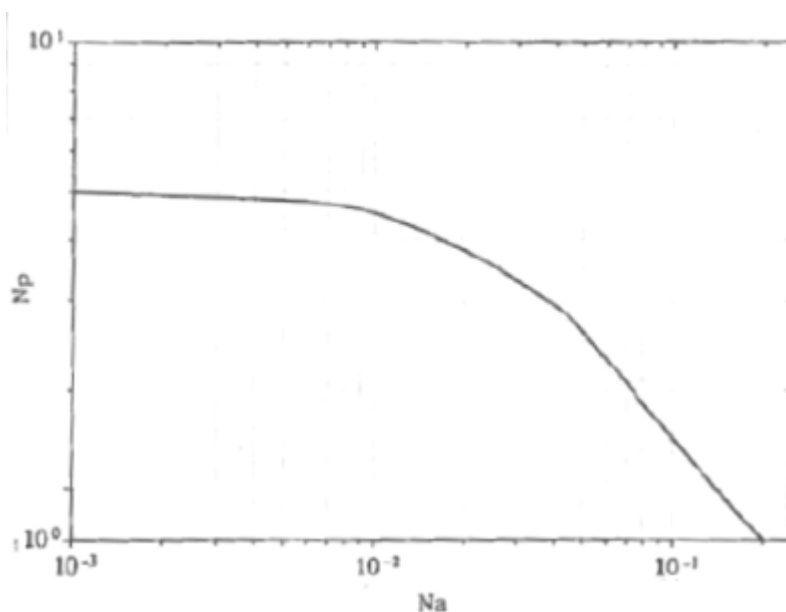


Figura 25 Gràfica de la relació entre el número de potència ( $N_p$ ) i el número d'aeració ( $N_a$ ) [1].

### 7.1.6. Càlculs numèrics

Les dimensions del bioreactor són 0,90 m de diàmetre i està equipat amb un agitador de disc tipus Rushton. El tanc disposa de pantalles deflectores i les proporcions geomètriques dels diferents elements s'estableixen segons la Figura 22.

Per a trobar la viscositat, s'ha considerat la màxima viscositat a la que es pot arribar amb la màxima concentració de  $\epsilon$ -PL. Amb les dades de viscositat d'altres polímers catiónics [29] es troba que la viscositat de dissolucions de polímers, que contenen grups NH i de pes molecular semblant al habitual per la  $\epsilon$ -PL (15000 g/mol), variaria entre 9 mPa·s i 50 mPa·s:

$$\text{viscositat}_{5\%, 25^\circ\text{C}} \sim 50 \cdot 10^{-3} \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}} = 0,05 \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}}$$

Per tant, es defineix com el medi de treball amb una densitat de  $1000 \text{ kg/m}^3$ , i una viscositat de  $0,05 \text{ kg/m} \cdot \text{s}$ .

Les condicions d'operació establertes [28] són: cabal d'aeració de 1 vvm (volum d'aire per volum de fermentador i minut) i una velocitat d'agitació de 300 rpm.

En base als paràmetres de treballi les mesures de disseny del fermentador, es pot calcular la potència necessària per al nostre sistema i les mesures del nostre sistema d'agitació.

Per tal de determinar el diàmetre de l'impulsor:

$$D = \frac{T}{3} = \frac{0,90 \text{ m}}{3} = 0,30 \text{ m}$$

(19)

Es calcularà la potència a partir del número d'aeració descrit anteriorment. Per aquest fet es necessita el cabal de gas, calculat a l'apartat anterior.

$$Q_g = 8,33 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{s}}$$

Número d'aeració:

$$N_a = \frac{8,33 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}^3}{\text{s}}}{\frac{300 \text{ rpm}}{60 \text{ s}} \cdot \left(\frac{0,90 \text{ m}}{3}\right)^3} = 0,062$$

(20)

Número de potència: a partir del número d'aeració i la gràfica de la Figura 25.

$$N_p = 2,2$$

Pera obtenir el valor de la potència absorbida pel sistema airejat, s'haurà d'aïllar la incògnita de la equació 18:

$$P_g = N_p \cdot \rho_g \cdot N^3 \cdot D^5$$

(21)

$$P_g = 2,2 \cdot 1000 \cdot \left(\frac{300}{60}\right)^3 \left(\frac{0,90}{3}\right)^5 = 668 \text{ W}$$

Dels càlculs realitzats anteriorment es determina la potència que s'haurà de subministrar al bioreactor. Aquesta haurà de ser de com a mínim 668 W.

Finalment, es selecciona un motor de 3000 W per a tenir suficient marge de potència tenint en compte la baixada de rendiment en aquests tipus d'aparells en les condicions de treball [28] i per fer front d'altres possibles improvisos.

### 7.1.7. Controls de temperatura i pH

- **Termòmetre**

No s'espera un sobreescalfament del sistema, ja que la fermentació treballa en un rang de temperatures proper als 30°C. El sistema de control de temperatura estarà connectat a un termòstat que alhora es trobarà connectat a la resistència elèctrica anteriorment descrita, procedint a la seva activació en cas que fos necessari.

- **PH-metre**

Com a paràmetre bioquímic únicament es contemplarà el pH, per mitjà de la sonda adient.

Segons les dades de les fonts consultades el pH disminueix fortament mentre dura la fermentació. A partir de les 72 h cal mantenir el pH a un valor de 4 fins el final del procés. Això es durà a terme de forma automàtica addicionant NaOH (2mol/L) amb una bomba peristàtica. Un controlador electrònic facilitarà el règim d'addició segons les dades proporcionades pel sensor de pH.

## 7.2. Dimensionat del bioreactor

L'equip que s'ha dissenyat és un bioreactor per a la producció de poli-èpsilon-lisina per fermentació de la glucosa.

L'objectiu del disseny obtingut a apartats anteriors és donar la forma i dimensions òptimes per realitzar el procés desitjat.

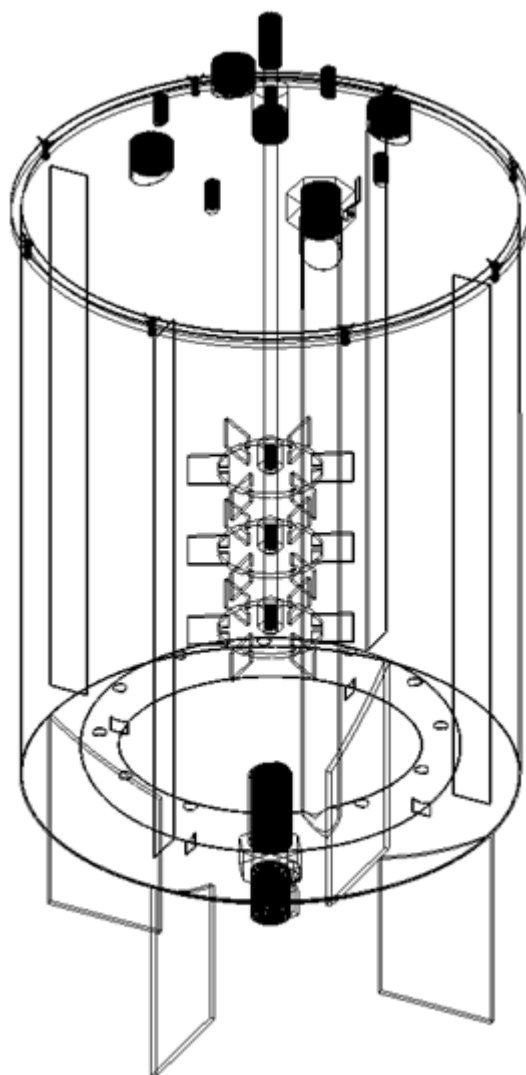
Al següent apartat es mostra el dimensionat del bioreactor definit anteriorment, modelat mitjançant el software de disseny tridimensional *Solid Works DDS 2016* [30].

Els plànols detallats del bioreactor es troben adjunts a l'Annex C.



*Figura 26 Vista en 3D del bioreactor dissenyat durant el projecte.*

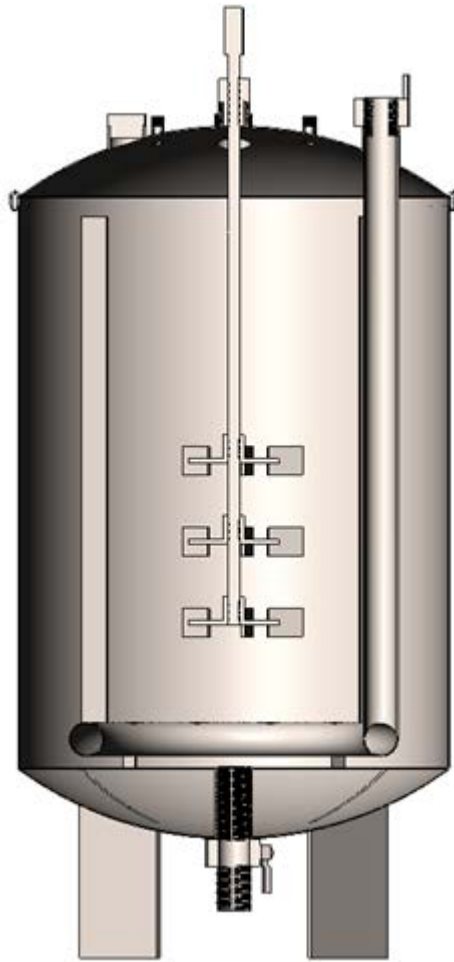
Tot seguit es mostren talls de secció que permeten apreciar els components interns del bioreactor.



*Figura 27 Components interns del bioreactor dissenyat durant el projecte.*



*Figura 28* Vista de secció del bioreactor.



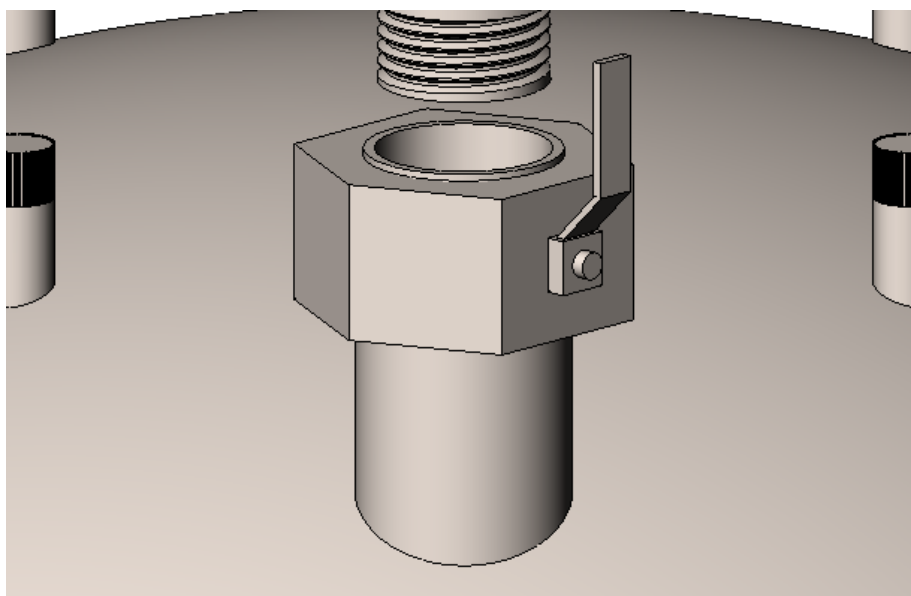
*Figura 29 Vista de secció del bioreactor.*

La tapa conté tres ports d'entrada, l'eix de l'agitació, quatre ports per introduir el sistema de control de paràmetres (temperatura i pH) i el conducte d'entrada de l'oxigen.



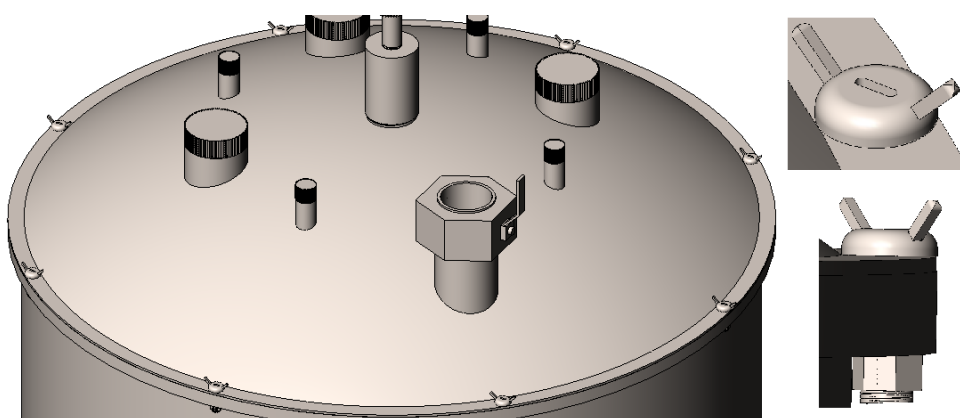
*Figura 30 Vista en 3D de la tapa del bioreactor.*





*Figura 31 Sistema d'entrada d'oxigen.*

El sistema de subjecció de la tapa amb el bioreactor són uns cargols tipus papallona. N'hi ha 8 distribuïts al llarg del perímetre de la tapa.



*Figura 32 Cargols tipus papallona.*

Tot seguit es pot veure el detall del sistema d'agitació, compost per tres discos distribuïts verticalment. Cadascun d'ells està format per 6 pales tipus Rushton. Aquestes són les més comunes als fermentadors. L'agitació es produeix girant entorn a un eix, el qual està dirigit per un motor de 3000 W, situat a l'exterior del bioreactor.

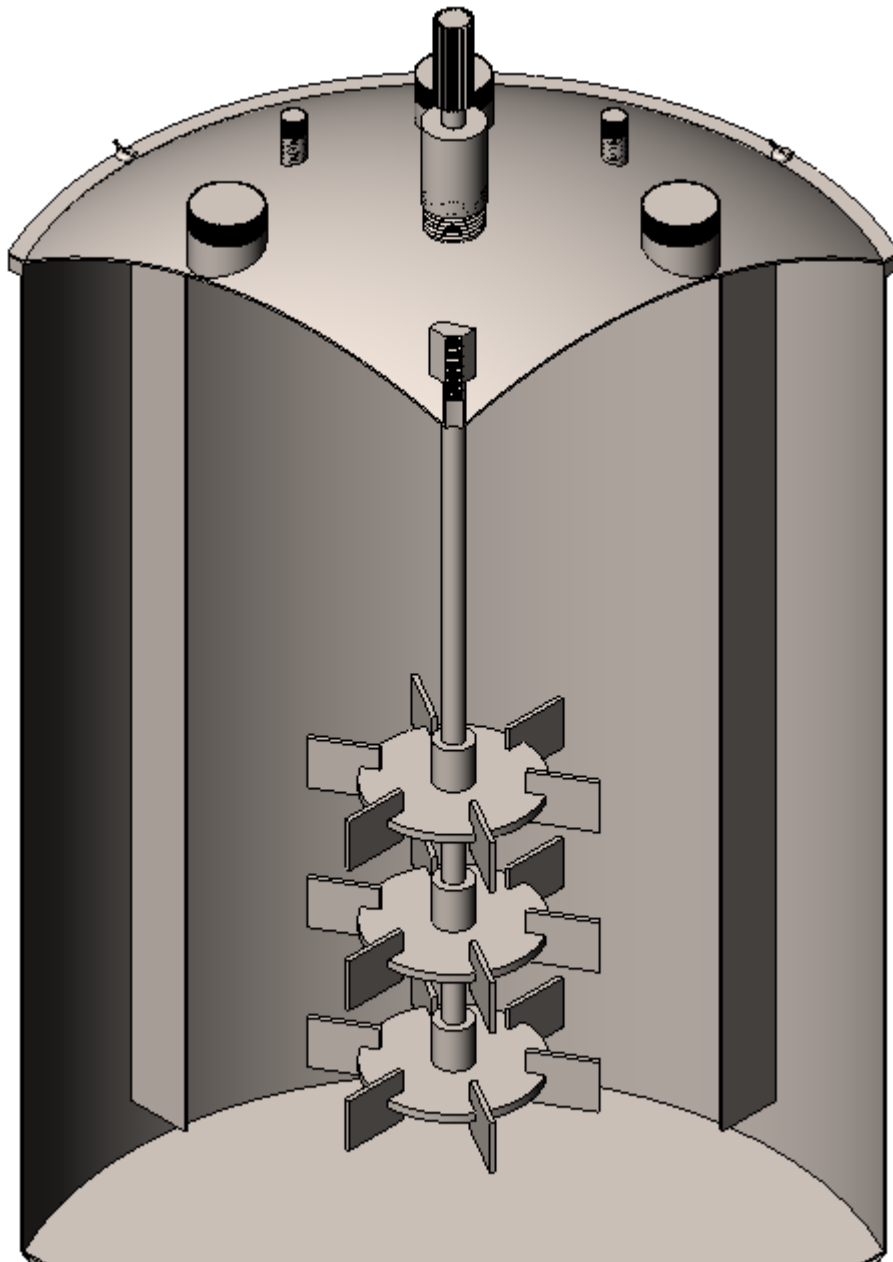


Figura 33 Sistema d'agitació.

A més, el bioreactor compta amb quatre deflectors units a la paret del vas. La separació és de 90° entre ells.



*Figura 34 Vista de secció. Detall dels deflectors.*

El sistema d'aeració consisteix en l'entrada d'oxigen per un conducte vertical, que es troba connectat a un cercol, que distribueix l'aire homogèniament en el diàmetre del bioreactor, gràcies als orificis dels que disposa, deixant sortir les bombolles constantment.

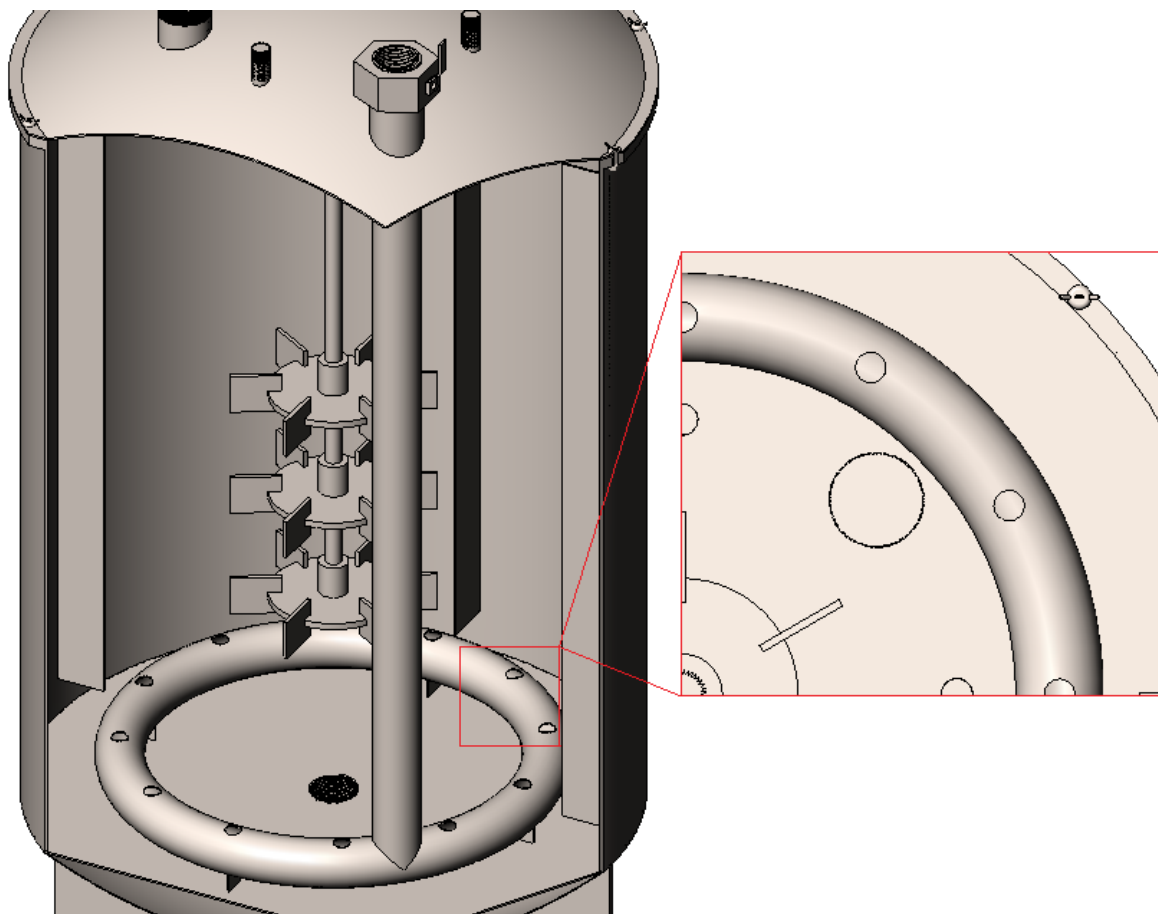


Figura 35 Sistema d'aeració.

### 7.3. Simulació numèrica del procés

Per iniciar els càlculs de disseny, s'estableix com a requisit una producció de 900 kg de  $\epsilon$ -PL a l'any.

Prenent com a referència els experiments realitzats a l'assaig [3], es considera que la concentració inicial de substrat és de de 50 kg/m<sup>3</sup>.

#### 7.3.1. Càlculs de productivitat i volums

D'acord amb les dades experimentals de l'article referenciat, es calculen els següents paràmetres de la fermentació. Les dades completes de referència i els càlculs es detallen a l'Annex A:

$$\mu_{max} = 0,075 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 15 \text{ g/L}$$

$$Y_{C/S} = \frac{C_{cèl\cdot lules}}{C_{glucosa}} = 0,7$$

$$Y_{P/S} = \frac{C_{\epsilon-PL}}{C_{glucosa}} = 0,18$$

Una vegada s'estableixen aquestes dades cinètiques es pot representar gràficament la corba de creixement microbià i de producció de  $\epsilon$ -PL del procés.

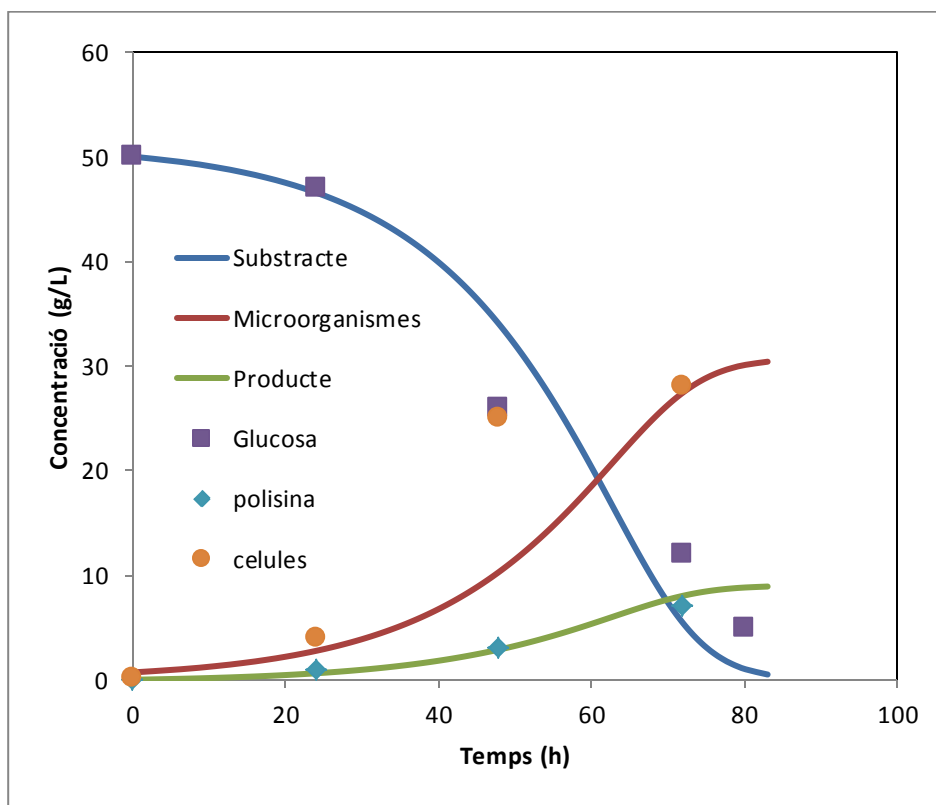


Figura 36 Corba de creixement microbià i de producció de  $\epsilon$ -PL (Dades numèriques calculades per a construir el gràfic a l'ANNEX B).

A la gràfica anterior es pot observar que a l'inici del procés la concentració de glucosa és de 50g/L i la de bacteris és gairebé de 0. A mesura que avança el temps, la concentració de reactiu va disminuint i la concentració de poli-èpsilon-lisina va en augment, però a un ritme més lent.

A partir de les 72 h la fermentació funciona en mode fed-batch, la concentració de glucosa es manté constant al voltant dels 10 g/L; el que suposa anar afegint uns 1,04 g de glucosa per hora. En aquestes condicions la concentració cel·lular es manté constant (28 g/L) mentre que augmenta pràcticament linealment la concentració de producte a raó de 0,46 g/h. Es a dir, en aquest punt la glucosa afegida s'usa per augmentar la producció de  $\epsilon$ -PL.

A les 144 h la concentració de  $\epsilon$ -PL arriba als 40 g/L, un valor prou bo per pensar en la producció pilot o semiindustrial d'aquest biopolímer.

## 8. Condicions d'operació i seguretat

Les condicions d'operació i seguretat del bioreactor han de comprendre tant les normes de conducta habitual d'una persona envers el reactor com les normes i procediments necessaris en cas de fallada del sistema amb la finalitat de prevenir i minimitzar els accidents.

L'alçada de disseny del bioreactor no fa necessari l'ús de cap tipus de superfície elevada per a la manipulació o control del mateix. Tot i això, en el cas que es necessités un suport extra a l'hora d'alimentar el bioreactor o cap altre tipus d'acció, s'han d'extremar les precaucions i fer-ho amb la presència de dues persones en el temps de durada de les operacions de manipulació del reactor.



Figura 37 Equips de protecció [31].

Convé destacar que el bioreactor no treballa ni a altes temperatures ni a altes pressions, tot i que es recomana la utilització de guants i equips de protecció ocular en el moment d'operació.

El codi de vestimenta és una bata de laboratori en tot moment i la utilització de sabates de seguretat per evitar possibles accidents.

Per a la seva neteja es recomana l'ús d'aigua calenta o vapor, inclús es podria utilitzar a pressió per a facilitar la neteja de les part de difícil accés. En tot moment és recomanable l'ús dels equips de protecció esmentats amb anterioritat. L'operació s'ha d'efectuar en tot moment amb molta precaució.





## 9. Estudi econòmic

L'anàlisi econòmica del projecte és una part fonamental del mateix, ja que la disponibilitat de capital està lligada a les característiques dels materials i components seleccionats, en el nostre cas, per al bioreactor dissenyat.

L'estudi econòmic inclou el càlcul del cost de l'equip, detallant el preu de tots els components, i el cost de l'enginyeria, és a dir, el cost del treball de l'enginyer assignat a la realització d'aquest projecte.

La valoració de l'estudi és orientativa per a una planta pilot, en cas de voler realitzar un projecte a nivell de producció en cadena o industrial els resultats diferirien. Es faria necessari implementar a l'estudi una anàlisi més acurada, introduint-hi l'estudi de viabilitat o fluxos de fons descomptats, entre d'altres.

Per començar s'ha d'avaluar el cost de l'equip proposat durant el projecte, incloent el dels seus components, tanmateix s'ha de valorar el cost intel·lectual de l'enginyer.

El costos derivats de la instal·lació del bioreactor no han estat considerats, perquè els objectius del projecte es limiten al disseny i dimensionament, així doncs no s'ha valorat aquest aspecte.

Com a mesura preventiva, i en previsió de possibles costos addicionals, s'introdueix un augment del 10% del cost total del bioreactor.

El preu final del bioreactor per a la producció de 900 kg de poli-èpsilon-lisina l'any a partir de glucosa per fermentació de *Streptomyces albulus* és de 23946,26 €. El cost final després de sumar l'IVA (21 %) seria de 28974,98 €.

	Component	Preu	unitats	Quantitat	Preu total (€)
Bioreactor	Vas AC316L -3mm gruix-	65,00	€/kg	135,91 kg	8834,15
	Tapa AC316L -3mm gruix-	65,00	€/kg	17,72 kg	1151,80
	Deflectors	65,00	€/kg	7,88 kg	512,23
Cargols	Cargol	2,99	€/u	8 u	23,92
	Femella	0,50	€/u	8 u	4,00
	Tap rosca gran	10,00	€/u	3 u	30,00
	Tap rosca petita	10,00	€/u	4 u	40,00
	Vàlvula de bola	90,96	€/u	2 u	181,92
Altres sistemes	Motor 3kW	770,00	€/u	1 u	770,00
	Agitador Rushton	135,00	€/u	3 u	405,00
	Aeració	230,00	€/u	1 u	230,00
Sistemes de control	PH-metre	129,90	€/u	1 u	129,90
	Bomba peristàltica	2860,00	€/u	1 u	2860,00
	Controlador automàtic	790,00	€/u	1 u	790,00
	Termòmetre	39,70	€/u	1 u	39,70
	Termòstat	29,90	€/u	1 u	29,90
	Resistència	45,90	€/u	1 u	45,90
Manipulació	Operació de fabricació	40,00	€/h	40 h	1600,00
Extres	Improvisos			+10% total	1767,84
<b>TOTAL BIOREACTOR</b>	<b>Pressupost total bioreactor</b>				<b>19446,26</b>
<b>PERSONAL</b>	Hores d'enginyeria	15,00	€/h	300	4500,00
<b>TOTAL</b>					<b>23946,26</b>

Taula 5 Pressupost final del projecte.

## 10. Estudi de l'impacte ambiental

Per realitzar l'estudi de l'impacte ambiental, s'ha decidit efectuar una avaluació de les emissions que produirà l'operació del bioreactor dissenyat i les emissions de CO<sub>2</sub> que es produïrien en la destrucció de la glucosa residual utilitzada anualment en el nostre procés. D'aquesta manera es calcularà l'impacte del procés.

### 10.1. Càlcul de les emissions del procés

En primer lloc es calculen les emissions de CO<sub>2</sub> que generarà l'ús del bioreactor. A tal efecte es consideraran les emissions generades pel motor d'agitació i la resistència elèctrica. En el nostre cas, el motor té una potència de 3000 W, treballa 270 dies l'any durant 24 h al dia:

$$3 \text{ kW} \cdot 270 \text{ dies} \cdot 24 \text{ h} = 19440 \text{ kWh}$$

Seguidament es calcula el consum de la resistència. A tal efecte es considera la energia necessària per a escalfar el lot des dels 25°C inicials fins als 30°C, temperatura òptima d'operació.

$$m \cdot c_e \cdot \Delta T = 500 \text{ kg} \cdot 4,1868 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \cdot 5 \text{ K} = 10467 \text{ kJ}$$

$$10467 \text{ kJ} \cdot 45 \text{ lots} \cdot \frac{1 \text{ kWh}}{3600 \text{ kJ}} \cong 131 \text{ kWh}$$

Per tant, el consum elèctric anual a conseqüència de l'operació del reactor és de 19571 kWh.

D'acord amb l'Oficina Catalana del Canvi Climàtic [32], per cada kWh de consum elèctric, es generen 302 g CO<sub>2</sub>:

$$19571 \text{ kWh} \cdot 302 \frac{\text{g CO}_2}{\text{kWh}} \cdot \frac{1 \text{ kg CO}_2}{1000 \text{ g CO}_2} = 5910,44 \text{ kg CO}_2$$

L'ús del bioreactor durant un any tindrà un impacte sobre l'escalfament global de 5910,44 kg CO<sub>2</sub>.

A partir de la cinètica de la reacció i la simulació numèrica es dedueix que al final de cada lot queden en el medi 10 g/L de glucosa. Si aquesta glucosa passés a CO<sub>2</sub>, l'impacte d'aquesta transformació seria:

$$500 \text{ L} \cdot 0,01 \frac{\text{kg Glucosa}_{\text{residual}}}{\text{L} \cdot \text{lot}} \cdot 45 \text{ lots} = 225 \text{ kg Glucosa}_{\text{residual}}$$

$$225 \text{ kg Glucosa} \cdot \frac{1000 \text{ g Glucosa}}{1 \text{ kg Glucosa}} \cdot \frac{1 \text{ mol Glucosa}}{180 \text{ g Glucosa}} \cdot \frac{6 \text{ mol CO}_2}{1 \text{ mol Glucosa}} \cdot \frac{44 \text{ g CO}_2}{1 \text{ mol CO}_2} \cdot \frac{1 \text{ kg CO}_2}{1000 \text{ g CO}_2} \\ = 330 \text{ kg CO}_2$$

Així, l'impacte que tindrà el procés, tenint en compte l'energia consumida pel bioreactor i el CO<sub>2</sub> generat en l'eliminació de la glucosa sobrant, és de 6240,44 kg CO<sub>2</sub>/any.

Val a dir que el CO<sub>2</sub> que aporta la glucosa és un CO<sub>2</sub> net, perquè la glucosa prové d'una font renovable. Malgrat tot, s'ha preferit tenir-ho en compte per compensar l'impacte que té l'obtenció i el refí de la glucosa per dur a terme aquest procés.

Si es calcula la generació de CO<sub>2</sub> en unitats específiques de producte:

$$\frac{6240,44 \text{ kg CO}_2/\text{any}}{900 \text{ kg } \varepsilon - PL/\text{any}} = 6,93 \text{ kg CO}_2/\text{kg } \varepsilon - PL$$

Comparat amb altres materials convencionals, l'obtenció d'aquest biopolímer té un impacte moderat. Per exemple, el polietilè genera 1,87 de kg de CO<sub>2</sub> equivalent per kg de plàstic en la seva fabricació. Per contra, el PMMA i altres derivats poliacrílics aportarien fins a 8,9 kg de CO<sub>2</sub> per kg [33].

## 10.2.Ecoindicador 99

En segon lloc, per avaluar les implicacions ambientals del bioreactor ens basem en el càlcul d'unitats d'impacte ambiental presentades per Ashby [34].

L'ecoindicador és una eina, un valor, que indica l'impacte ambiental unitari d'un material, un procés, un medi de transport, l'ús d'un combustible o l'impacte ambiental del rebuig d'un material. Les categories descrites creen diferents grups ("Ecoindicadors de"), totes elles estan estretament vinculades amb les diferents etapes del cicle de vida del producte o material.

Els ecoindicadors 99 es calculen amb milipunts, els quals estan relacionats amb els kg de material, i expressen l'impacte del cicle de vida del material o producte. Aquest mètode va ser ideat per Goedkoop a finals del segle passat.

A continuació es mostren els ecoindicadors per als elements constitutius del reactor:

Component	Material	Quantitat	Ecoindicador	TOTAL -milipunts-
Vas	AC316L	135,91 kg	910/kg	123678,1
Tapa	AC316L	17,72 kg	910/kg	16125,2
Deflectors	AC316L	7,88 kg	910/kg	7170,8
Cargol	AC316L	1,78 kg	910/kg	1619,8
Rosca	AC316L	0,24 kg	910/kg	218,4
Taps rosca	AC316L	1,68 kg	910/kg	1528,8
Vàlvula de bola	AC316L	2,73 kg	910/kg	2484,3
Motor	Fe / Cu*	18,3 kg	820/kg	15006
Eix	AC316L	2,3 kg	910/kg	2093
Agitador	AC316L	15,72 kg	910/kg	14305,2
Aeració	AC316L	15,71 kg	910/kg	14296,1
Equips de mesura	-	-	800	800
Operació de fabricació	AC316L	201,67 kg	840	169402,8
Transport	-	150 km	34/km	5100
Tractament** acer	-	201,67 kg	- 102/kg	- 20570,34
Tractament** Fe	-	9,15 kg	- 70/kg	- 640,5
Tractament equips de mesura	-	-	- 200	- 200
<b>TOTAL</b>				<b>352417,7</b>

\* 50% Fe 50% Cu

\*\* Reciclatge, incineració i altres.

*Taula 6 Ecoindicadors 99 per als elements més significatius del bioreactor.*

El valor numèric obtingut a partir de les taules amb ecoindicadors 99 és de 352417,7.

Per a poder valorar el resultat, el cas més utilitzat és el d'una cafetera convencional, que suma 536 milipunts. O per exemple, les peces banyades en zinc tenen un ecoindicador de 472 milipunts/kg, i el níquel 2830 milipunts/kg [35].



## 11. Organització del projecte

Una tècnica habitual a l'hora de planificar un projecte és realitzar un Diagrama de Gantt, on es poden distingir de forma clara totes les accions que s'han de dur a terme i la intensitat de les mateixes, per a una millor organització al llarg del temps i una distribució de la càrrega proporcional a la dificultat associada a la tasca.

A continuació es detalla el Diagrama de Gantt utilitzat per a la realització d'aquest projecte:

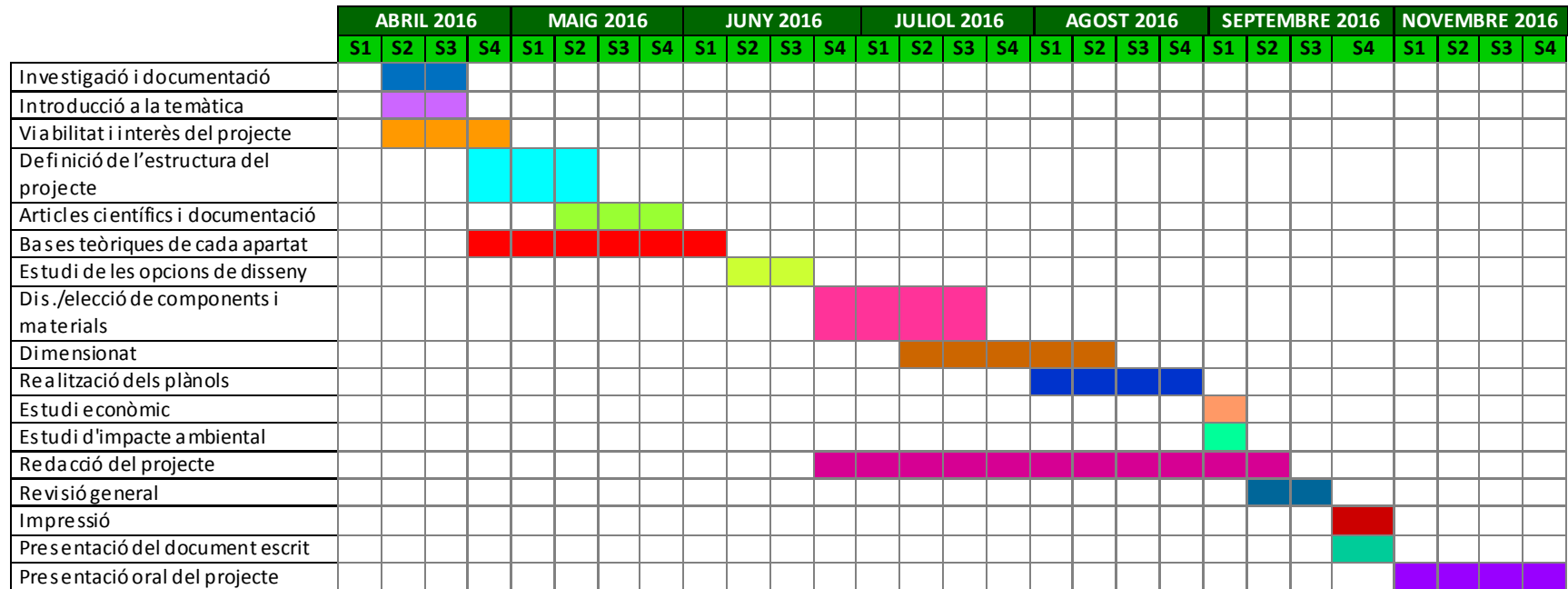


Diagrama 1 Diagrama de Gantt del projecte.







## Conclusions

En aquest projecte s'ha descrit el disseny d'un bioreactor per produir el biopolímer  $\epsilon$ -PL per fermentació de la glucosa per la bactèria *Streptomyces albulus*, fins a unes quantitats de 900 kg cada any en un règim de producció per lots i en volums propis d'una planta pilot.

Havent estudiat les diferents alternatives per al disseny del bioreactor a escala planta pilot, s'ha decidit dur a terme el disseny d'un bioreactor de tanc agitat discontinu, que pot treballar en mode fed-batch, equipat amb un sistema d'aeració, sonda de pH i sistema de control de temperatura.

Els components que formen el reactor són: un vas de forma cilíndrica d'acer inoxidable AC316L, una tapa equipada amb els ports necessaris per abastar les necessitats de mesurament de paràmetres, un sistema d'agitació impulsat per un motor de 3000 W i format per 3 discos de 6 pales tipus Rushton, 4 deflectors, un sistema d'aeració compostat per un cercol situat a la base del reactor facilitant una millor transferència de l'oxigen en la dissolució. Tanmateix disposa de sistemes de manteniment de la temperatura i del pH de la dissolució.

En relació al dimensionat del reactor s'han considerat els paràmetres d'operació i les condicions de treball, així com els requeriments del sistema i la dissolució. El bioreactor té un volum real de 750L i unes dimensions de 1505x900mm, trobant-se aquests paràmetres, dins dels estàndards per a una planta pilot.

A partir de les dades proposades per Kahar (Kahar, P *et al.*2001) al seu article "*Enhancement of  $\epsilon$ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control.*" s'ha analitzat la cinètica de la reacció per a la producció de poli-èpsilon-lisina, obtenint 20,0 kg de poli-èpsilon-lisina per lot, a una concentració de 40,0 g/L (6 dies), a partir de glucosa a una concentració inicial de 50 g/L, resultant en una producció anual de 900 kg de poli-èpsilon-lisina.

El motor del sistema d'agitació té una potència de 3000 W, la velocitat òptima d'agitació per a la dissolució és de 300 rpm, i el sistema d'aeració proporciona 1 vvm.

Un model tridimensional del bioreactor ha estat dissenyat emprant el software de dibuix SolidWorks i, mitjançant el mateix, s'han dibuixat els plànols d'enginyeria que permetran la fabricació de l'equip per part d'una empresa.

El cost estimat per a la producció de l'equip és de 19446,26 euros. Amb tot, el cost total de la execució del projecte és de 28974,98 euros.

La operació del bioreactor en funcionament normal genera 6240,44 kg CO<sub>2</sub> cada any. Factoritzat per la producció de  $\epsilon$ -PL surt 6,93 kg/kg, quantitat intermèdia comparada amb altres materials polimèrics.



## Bibliografia

Les referències utilitzades per a realitzar el projecte són les que es descriuran a continuació. La utilització de les mateixes durant la redacció de la memòria ha estat indicada entre claudàtors al lloc corresponent..

### Referències bibliogràfiques

- [1] Gòdia F., A. i López J.; Casas C. et al. *Ingeniería bioquímica*. Madrid: Ed. Síntesis, 1998
- [2] Steinbüchel, A.; i Hofrichter, M. *Biopolymers, Volume 7, Polyamides and Complex Proteinaceous Materials I*. Ed. Wiley-VCH, cop. 2001-2003.
- [3] Kahar, P. et al. *Enhancement of  $\epsilon$ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Tòquio: Vol 91(2), 2001, p 190-194.
- [4] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Popular topics. What is Green Chemistry. Washington, 2014  
[<https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry.html>, juliol 2016].
- [5] Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Nova York: Oxford University Press, 1998
- [6] Servei de Seguiment i Informació d'Activitats *Informe de valoració de les declaracions PRTR-CAT corresponents a les emissions de l'any 2014*. Barcelona: 2016
- [7] INGENIERÍAQUIMICA.ORG. Artículos. *Los 9 peores desastres de la industria química*. Argentina, 2015.  
[<http://www.ingenieriaquimica.org/articulos/peores-desastres-industria-quimica>, Juliol 2016].
- [8] Ballesteros, M. *Biorrefinerías: Estado actual y desarrollo futuro*. Madrid: CIEMAT, 2016  
[<http://agripa.org/download-file/63823-105861>, juliol 2016]
- [9] Chassenieux, C.; Durand, *Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks*. Ed. Wiley-VCH, 2013, cap. 1.
- [10] EUROPEAN BIOPLASTICS FOUNDATION. Publications. *Frequently asked questions on bioplastics*. Berlín: 2016.  
[<http://www.european-bioplastics.org/news/publications/>, juny 2016].

- [11] HOCHSCHULE HANNOVER Institute for Bioplastics and Biocomposites. *Statistics*. Hannover: 2016.  
[<http://ifbb.wp.hs-hannover.de/downloads/>, setembre 2016].
- [12] CHEMISTRY LEARNER. *Biopolymer*. Calcuta: 2015  
[<http://www.chemistrylearner.com/biopolymer.html>, juliol 2016].
- [13] ENVASES PLÁSTICOS ALIMENTARIOS. *Nuevos Materiales: Bioplásticos*. Valladolid  
[<http://www.eis.uva.es/~macromol/curso13-14/envases/nuevo.html>, juliol 2016].
- [14] Ogunleye A., Bhat A. *Poly- $\gamma$ -glutamic acid: production, properties and applications*. *Microbiology Society*. Londres: 161, 2015, p 1-17.
- [15] Daugulis et al. *Partitioning Bioreactors Current Opinion in Biotechnology* 1997 8, 169.
- [16] Nielsen, J. And Villadsen, J., *Bioreaction engineering principles*, Plenum Press, New York 1994.
- [17] Kompala, D.S., Ramkrishna, D., Jansen, N.B., Tsao, G.T., *Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models*. *Biotechnology and Bioengineering* 1986, 28, 1044–1055
- [18] Cunningham, A. B.; *BIOFILMS: The Hypertextbook. Biofilm Growth and Development*. 2010. Chapter 2, section 2.  
[<https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter002/section002/black/page001.html>, agost 2016]
- [19] Shih I-L. *Microbial synthesis of poly( $\epsilon$ -lysine) and its various Applications*. Elsevier. *Bioresource Technology*. Vol 97 (9), 2004, p. 1148-1159.
- [20] Shukla, S.C.; Mishra, A. *Optimization of Process Parameters for  $\epsilon$ -PolyLysine Production from Mixed Carbon Source using "One Factor at a Time" Technique*. Elsevier. *APCBEE Procedia*. Vol 2, 2012, p 120-124.
- [21] Bou, J.. *Apunts de l'assignatura de Reactors Avançats*. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química 2011
- [22] Brown McFarlane. *Aceros inoxidable tipo 316 y 316L*.  
[<http://www.brownmac.com/products/stainless-steel-plate/316-and-316l-spanish.aspx>, juliol 2016]
- [23] Milwaukee inst. products. *TH310 Pocket Thermometer with Stainless Steel Probe*. 2011.  
[<http://www.milwaukeeinst.com/site/products/products/thermometers/123-products-g-thermometers-g-th310>, juliol 2016]

- [24] HACH Company. *WATER QUALITY METERS & PROBES*. 2015  
[<http://latam.hach.com/asset-get.download.jsa?id=7664029560>, juliol 2016]
- [25] Watson Marlow Bredel Pumps: *403U/R1, 403U/L and 403U/L2 Engineering and Technical data*.  
[<http://www.sincaninc.com/pumps/perist/watson/400/data-403url-us-01.pdf>, juliol 2016]
- [26] UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR. Departamento de Ingeniería Química. *Reactores Químicos y Biológicos. CAPÍTULO 8*. 2014  
[<http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO%208.pdf>, juliol 2016]
- [27] LENNTECH Water Treatment Solutions. *MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO*.  
[<http://www.lenntech.es/biblioteca/index.htm>, juliol 2016]
- [28] Nienow, A. *Stirred Bioreactor Engineering for Production Scale, Aerobic Fermentations: Part 2*. Merrick and Co Technical Paper, Aurora (CO, USA). 2012.
- [29] Yacob N. et al. *Determination of viscosity-average molecular weight of chitosan using intrinsic viscosity measurement*. 2013. Journal Of Nuclear And Related Technologies, 10, 39
- [30] Software de disseny CAD. [[http://www.solidworks.es/sw/education/SDL\\_form.html](http://www.solidworks.es/sw/education/SDL_form.html), juliol 2016]
- [31] González M. C., Detrell S. M. *Riesgo Químico. Guía básica de información y sensibilización*. SANTIAGO DE COMPOSTELA: Confederación Intersindical Galega 2011
- [32] OFICINA CATALANA DEL CANVI CLIMÀTIC. *Nota Informativa Sobre la metodología d'estimació del mix elèctric per part de l'Oficina Catalana Del Canvi Climàtic*. 2016.  
[[http://canviclimatic.gencat.cat/web/.content/home/reduex\\_emissions/factors\\_emissio\\_associats\\_energia/160219\\_Nota-metodologica-mix\\_cat.pdf](http://canviclimatic.gencat.cat/web/.content/home/reduex_emissions/factors_emissio_associats_energia/160219_Nota-metodologica-mix_cat.pdf), setembre 2016]
- [33] PLASTICS EUROPE. Association of plastics manufacturers. *ECO PROFILES*.  
[<http://www.plasticseurope.org/plastics-sustainability-14017/eco-profiles.aspx>, setembre 2016]
- [34] GUIA DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS AMBIENTALES DE PRODUCTO - Edición revisada 2006. . Bilbao. Editorial IHOBE.
- [35] Goedkoop, M.; Eftting, S. *Método para evaluar el impacto ambiental a lo largo del Ciclo de Vida*. 1999. [<http://www.istas.net/risctox/gestion/estructuras.pdf>., setembre 2016]

## Bibliografia complementària

- [1] Young, M. M. *Comprehensive biotechnology* (2nd edition). Ed. Elsevier, 2011
- [2] Benz, G.T. *Bioreactor design for chemical engineers*. American Institute for Chemical Engineers. 2011 [[www.aiche.org/cep](http://www.aiche.org/cep), juny 2016]
- [3] Kahar, P. Production of  $\epsilon$ -Polylysine in an Airlift Bioreactor (ABR). Elsevier. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol 93 (3), 2002, p 274-280.