



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster en Ingeniería Química

OBTENCIÓN DE *BUILDING-BLOCKS* POR FERMENTACIÓN



Memoria

Autor: Alberto Cendón Fernández

Director: Jordi Bou Serra

Departamento: EQ

Convocatoria: Octubre 2017

RESUMEN

El ácido metacrílico (MA) y el metacrilato de metilo (MMA) son de los monómeros más importantes para una amplia gama de productos poliméricos. El principal producto es el polimetilmetacrilato (PMMA), con un consumo cerca de los 2,1 millones de toneladas.

En este trabajo se ha realizado la obtención de *building blocks* por fermentación bacteriana a escala piloto en el laboratorio, en concreto, la obtención del ácido 2-metil-3-hidroxiopropanoico, que al ser deshidratado pasa a ser la unidad estructural o monómero de los metacrilatos, especialmente del metacrilato de metilo (MMA) y del polimetacrilato de metilo (PMMA), que es uno de los plásticos más importantes y usados hoy en día en la industria.

Este proyecto proporciona una ruta alternativa más verde y sostenible para la síntesis de ácido metacrílico a partir de 2-metil-1,3-propanodiol, un subproducto industrial de bajo coste, mediante su oxidación parcial con el uso de la bacteria *Gluconobacter oxydans*.

Durante el estudio se han realizado diversas fermentaciones, probando diferentes bacterias, sustratos, medios de cultivo y medios de fermentación, para poder llegar a obtener el producto deseado con el mayor rendimiento posible.

Finalmente, se ha conseguido obtener el producto de interés a un rendimiento más bajo de lo esperado 20-30%, debido principalmente a la falta de control de las condiciones de operación, principalmente la temperatura ambiente, lo que ha dado lugar a varios experimentos fallidos en los que no se ha obtenido el producto de interés, pero se ha cumplido el objetivo principal, demostrar su obtención por esta vía fermentativa.

ABSTRACT

Methacrylic acid (MA) and methyl methacrylate (MMA) are the most important monomers for a wide range of polymer products. The main product is polymethylmethacrylate (PMMA), with a consumption of about 2.1 million tonnes.

In this work, we have obtained the building blocks by bacterial fermentation at a pilot scale in the laboratory, specifically, the production of 2-methyl-3-hydroxypropanoic acid, which, when dehydrated, becomes the structural unit or monomer of the methacrylates, especially methyl methacrylate (MMA) and methyl polymethacrylate (PMMA), which is one of the most important plastics used today in the industry.

*This project provides a greener and more sustainable alternative pathway for the synthesis of methacrylic acid from 2-methyl-1,3-propanediol, a low-cost industrial byproduct, through its partial oxidation with the use of the bacterium *Gluconobacter oxydans*.*

During the study several fermentations were carried out, testing different bacteria, substrates, culture media and fermentation media, in order to obtain the desired product with the highest possible yield.

Finally, the product of interest has been obtained at a lower than expected yield of 20-30%, mainly due to the lack of control of the operating conditions, mainly the ambient temperatura, which has led to several failed experiments in which the product of interest has not been obtained, but the main objective has been achieved, demonstrate its obtaining by this fermentative route.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no es solo fruto del esfuerzo personal, sino que necesita de la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal. Con estas líneas quisiera mostrar mi agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres, el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí durante todos estos años, que me ha servido para seguir cumpliendo mis objetivos tanto personales como profesionales. Gracias, sin vosotros nada hubiera sido posible.

Agradecer a mi familia el estar siempre ahí cuando los necesito, aconsejándome y dándome ánimos, y a *os meus*, los amigos que completan mi familia, los que siempre están ahí aunque las circunstancias no se lo permitan. Gracias por aguantarme y animarme siempre.

A todos mis compañeros del Máster y del trabajo, algunos de ellos amigos, con los que he compartido mis ilusiones, trabajo y esfuerzo, que consiguieron darme el afecto necesario para disfrutar del día a día mientras completaba esta etapa de mi vida. Gracias por valorarme y enseñarme a ser un poco más ingeniero.

Por último, dar las gracias a mi tutor de proyecto Jordi Bou, por todo lo aprendido de él, tanto en el laboratorio como en clase, y por darme la oportunidad de realizar este proyecto tan interesante.

Finalizo estos agradecimientos con la frase de un importante científico, químico y microbiólogo:

«En la naturaleza, el papel de lo infinitamente pequeño es infinitamente grande»

Louis Pasteur

GLOSARIO

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS EN EUROPA (TON/AÑO) EN 2015 | 3 |
| FIGURA 2. DIAGRAMA DE FLUJO DE UNA BIORREFINERÍA | 7 |
| FIGURA 3. DIFERENTES RUTAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS PARA LA OBTENCIÓN DE INTERMEDIOS BASE C3 | 16 |
| FIGURA 4. COLONIAS DE ACETOBACTER CRECIDAS EN AGAR CON CARBONATO DE CALCIO QUE CONTIENE ETANOL COMO FUENTE DE ENERGÍA | 23 |
| FIGURA 5. BATCH. CURVA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE SUSTRATO. II FASE EXPONENCIAL; III FASE DE DESACELERACIÓN; IV FASE ESTACIONARIA | 30 |
| FIGURA 6. ESQUEMA DE LA CONVERSIÓN DEL 2M13PD A ÁCIDO METACRÍLICO POR FERMENTACIÓN BACTERIANA Y DESHIDRATACIÓN CATALÍTICA | 32 |
| FIGURA 7. ESQUEMAS DE UN REACTOR AIR LIFT Y UN REACTOR DE TANQUE AGITADO | 34 |
| FIGURA 8. ESQUEMA GENERAL DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN | 36 |
| FIGURA 9. ESQUEMA DE UN BIORREACTOR CON INDICACIÓN DE LOS CAUDALES Y CONCENTRACIONES DE ENTRADA Y SALIDA | 37 |
| FIGURA 10. VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UN PROCESO DE ESTERILIZACIÓN EN BATCH | 46 |
| FIGURA 11. PRINCIPALES ETAPAS REALIZADAS EN EL PROYECTO EXPERIMENTAL | 49 |
| FIGURA 12. ESQUEMA DE UN ESPECTROFOTÓMETRO | 52 |
| FIGURA 13. DATOS OBTENIDOS DE LA TURBIDEZ SEMILOGARÍTMICAMENTE FRENTE AL TIEMPO | 54 |
| FIGURA 14. ROTAVAPOR UTILIZADO EN EL LABORATORIO | 58 |
| FIGURA 15. ESQUEMA, ECUACIONES Y CORRELACIONES DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA | 60 |
| FIGURA 16. DESPLAZAMIENTO QUÍMICO EN RMN | 66 |
| FIGURA 17. MOLÉCULAS DE 2M13PD Y GLICEROL. | 69 |
| FIGURA 18. MOLÉCULAS DE 2M3HPA Y ÁCIDO GLICÉRICO | 70 |
| FIGURA 19. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR DE: 2-METIL-1,3-PROPANODIOL (VERDE), GLICEROL (AMARILLO), 1º FERM. 2M13PD (AZUL), 1º FERM. GLICEROL (ROSA), 2º FERM. 2M13PD (NEGRO) Y 2º FERM. GLICEROL (ROJO) | 70 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 20. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR DE: 2-METIL-1,3-PROPANODIOL (VERDE), GLICEROL (AMARILLO), 3º FERM. 2M13PD (VIOLETA), 3º FERM. GLICEROL (NARANJA), 4º FERM. 2M13PD (ROSA) Y 4º FERM. GLICEROL (AZUL) | 71 |
| FIGURA 21. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR DE: 2-METIL-1,3-PROPANODIOL (VERDE), GLICEROL (AMARILLO), 5º FERM. 2M13PD (VIOLETA), 5º FERM. GLICEROL (NARANJA), 6º FERM. 2M13PD (ROSA) Y 6º FERM. GLICEROL (VERDE) | 72 |
| FIGURA 22. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR DE: 2-METIL-1,3-PROPANODIOL (VERDE), GLICEROL (AMARILLO), 7º FERM. 2M13PD (AMARILLO ABAJO), 7º FERM. GLICEROL (VERDE ABAJO) | 73 |
| FIGURA 23. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR: GLICEROL (AMARILLO) VS 6º FERM. GLICEROL (GRIS) . | 74 |
| FIGURA 24. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR: 2M13PD (NARANJA) VS 6º FERM. 2M13PD (AZUL) | 74 |
| FIGURA 25. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR: 2M13PD (GRIS) VS 7º FERM. 2M13PD (NARANJA) | 75 |
| FIGURA 26. DIAGRAMAS OBTENIDOS POR FTIR (ABSORBANCIA): 2M13PD (GRIS) VS 6º FERM. 2M13PD (VERDE) VS 7º FERM. 2M13PD (NARANJA) | 75 |
| FIGURA 27. DIAGRAMA RMN DE LA MOLÉCULA DEL 2M13PD | 76 |
| FIGURA 28. RELACIÓN ENTRE LOS PICOS OBSERVADOS EN RMN Y LA MOLÉCULA DE 2M13PD | 77 |
| FIGURA 29. DIAGRAMA OBTENIDO POR RMN DE LA 6º FERM. 2M13PD | 77 |
| FIGURA 30. DIAGRAMA RMN DE LA MOLÉCULA DE 3H2MPA | 78 |
| FIGURA 31. DIAGRAMA RMN DE LA MOLÉCULA DEL GLICEROL | 79 |
| FIGURA 32. RELACIÓN ENTRE LOS PICOS OBSERVADOS EN RMN Y LA MOLÉCULA DE GLICEROL | 80 |
| FIGURA 33. DIAGRAMA RMN DE LA MOLÉCULA DE ÁCIDO GLICÉRICO | 80 |
| FIGURA 34. RELACIÓN ENTRE LOS PICOS OBSERVADOS EN RMN Y LA MOLÉCULA DE ÁCIDO GLICÉRICO .. | 81 |
| FIGURA 35. DIAGRAMA OBTENIDO POR RMN DE LA 6º FERM GLICEROL | 81 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| TABLA 1. PERSPECTIVAS DE FUTURO PARA LAS TECNOLOGÍAS BASADAS EN LA BIOMASA (BRDA, 2000).. | 8 |
| TABLA 2. RESUMEN DE LOS TIPOS DE BIORREFINERÍAS EN FUNCIÓN DE LA MATERIA PRIMA UTILIZADA (FERNANDO ET AL., 2006)..... | 12 |
| TABLA 3. POTENCIALES BUILDING BLOCKS (DEPARTAMENTO DE ENERGÍA DE EE.UU., 2010)..... | 14 |
| TABLA 4. PRINCIPALES SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS REFINERÍAS PETROQUÍMICAS Y LAS BIORREFINERÍAS..... | 15 |
| TABLA 5. MICROORGANISMOS DE INTERÉS INDUSTRIAL | 20 |
| TABLA 6. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA TURBIDEZ MEDIDA CON ESPECTROFOTÓMETRO (480 NM)..... | 53 |
| TABLA 7. CORRELACIONES DE LONGITUD DE ONDA EN UN FTIR..... | 64 |
| TABLA 8. TIPOS Y COMPOSICIONES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS..... | 67 |
| TABLA 9. DESCRIPCIÓN DE LOS ENSAYOS REALIZADOS DE FERMENTACIÓN | 68 |

Lista de Ecuaciones

| | |
|--|----|
| ECUACIÓN 1. RENDIMIENTO CELULAR TEÓRICO | 25 |
| ECUACIÓN 2. RENDIMIENTO CELULAR PRÁCTICO | 25 |
| ECUACIÓN 3. RENDIMIENTO EN PRODUCTO | 26 |
| ECUACIÓN 4. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS | 26 |
| ECUACIÓN 5. ECUACIÓN DE MONOD | 26 |
| ECUACIÓN 6. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA INHIBICIÓN COMPETITIVA..... | 27 |
| ECUACIÓN 7. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA INHIBICIÓN NO COMPETITIVA..... | 27 |
| ECUACIÓN 8. ECUACIÓN QUE AGRUPA EL TÉRMINO DE INHIBICIÓN | 27 |
| ECUACIÓN 9. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO PARA INHIBICIÓN POR SUSTRATO..... | 27 |
| ECUACIÓN 10. DERIVADA DEL RENDIMIENTO CELULAR..... | 27 |
| ECUACIÓN 11. RELACIÓN ENTRE VELOCIDADES DE CONSUMO DE SUSTRATO Y CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS..... | 28 |
| ECUACIÓN 12. VELOCIDAD DE CONSUMO DE SUSTRATO (I) | 28 |
| ECUACIÓN 13. VELOCIDAD DE CONSUMO DE SUSTRATO (II) | 28 |
| ECUACIÓN 14. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO | 28 |
| ECUACIÓN 15. CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS CON EL TIEMPO EN FUNCIÓN DE LA ECUACIÓN DE MONOD | 28 |
| ECUACIÓN 16. CONSUMO DE SUSTRATO CON EL TIEMPO EN FUNCIÓN DE LA ECUACIÓN DE MONOD | 28 |
| ECUACIÓN 17. SIMPLIFICACIÓN DE LA ECUACIÓN 15 | 28 |
| ECUACIÓN 18. SIMPLIFICACIÓN DE LA ECUACIÓN 16 | 29 |
| ECUACIÓN 19. INTEGRACIÓN DE LA ECUACIÓN 17 | 29 |
| ECUACIÓN 20. ECUACIÓN 19 CON LOGARITMOS..... | 29 |
| ECUACIÓN 21. INTEGRACIÓN DE LA ECUACIÓN 18 INTRODUCIENDO LA ECUACIÓN 19..... | 29 |
| ECUACIÓN 22. RENDIMIENTO BIOMASA/SUSTRATO..... | 29 |
| ECUACIÓN 23. CONCENTRACIÓN FINAL DE BIOMASA | 29 |
| ECUACIÓN 24. CORRECCIÓN DE LA ECUACIÓN 20 TENIENDO EN CUENTA LA FASE DE RETARDO | 30 |
| ECUACIÓN 25. BALANCE DE MATERIA EN UN BIORREACTOR..... | 36 |
| ECUACIÓN 26. VARIACIÓN DEL VOLUMEN DE CULTIVO CON EL TIEMPO | 37 |
| ECUACIÓN 27. BALANCE DE MATERIA PARA UN CULTIVO CONTÍNUO | 37 |
| ECUACIÓN 28. VARIACIÓN DEL VOLUMEN CON EL TIEMPO | 38 |

| | |
|---|----|
| ECUACIÓN 29. BALANCE DE MATERIA PARA UN CULTIVO FED BATCH | 38 |
| ECUACIÓN 30. BALANCE DE MATERIA PARA UN CULTIVO BATCH | 38 |
| ECUACIÓN 31. VARIACIÓN DE BIOMASA PARA UN CULTIVO BATCH..... | 39 |
| ECUACIÓN 32. VARIACIÓN DE SUSTRATO PARA UN CULTIVO BATCH | 39 |
| ECUACIÓN 33. VARIACIÓN DE PRODUCTO PARA UN CULTIVO BATCH | 39 |
| ECUACIÓN 34. VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO..... | 40 |
| ECUACIÓN 35. CINÉTICA DE ESTERILIZACIÓN | 45 |
| ECUACIÓN 36. INTEGRACIÓN DE LA ECUACIÓN 35 | 45 |
| ECUACIÓN 37. ECUACIÓN DE ARRHENIUS..... | 46 |
| ECUACIÓN 38. DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE ORGANISMOS VIABLES | 47 |
| ECUACIÓN 39. ECUACIÓN 38 CON LA ECUACIÓN DE ARRHENIUS | 47 |
| ECUACIÓN 40. DISMINUCIÓN DEL NÚMERO DE ORGANISMOS VIABLES TOTALES | 47 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|--------|--|
| 2M13PD | 2-metil-1,3-propanodiol |
| 3H2MPA | Ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico |
| ABE | Acetona-butanol-etanol |
| ACH | Acetona-cianohidrina |
| DDG | Residuos no fermentados de los granos (<i>distillers dried grains</i>) |
| EE.UU. | Estados Unidos de América |
| FTIR | Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier |
| GLP | Gas licuado de petróleo |
| IEA | Agencia Internacional de Energía |
| IR | Radiación infrarroja |
| MA | Ácido metacrílico |
| MMA | Metacrilato de metilo |
| OD | Unidades de densidad óptica |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PMMA | Polimetilmetacrilato |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| TLC | Cromatografía de capa fina (<i>thin layer chromatography</i>) |
| UV | Radiación ultravioleta |

Lista de Símbolos

| | |
|------------------|---|
| a | Constante que agrupa el término inhibición |
| A | Factor preexponencial o constante de Arrhenius |
| C* | Concentración de oxígeno disuelto |
| C _i | Concentración del componente i en el caudal de salida |
| C _{i1} | Concentración del componente i en la alimentación |
| E | Energía de activación |
| F ₁ | Caudal de alimentación |
| F ₂ | Caudal de salida |
| I | Concentración de inhibidor |
| k | Constante de velocidad de destrucción de microorganismos |
| K | Constante de distribución o de reparto |
| K _i | Constante de inhibición |
| K _{La} | Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno |
| K _s | Constante de saturación |
| N | Número de organismos viables al final |
| N/N ₀ | Fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor |
| N ₀ | Número de organismos viables inicialmente |
| P | Concentración de producto |
| P | Presión |
| q _s | Velocidad específica de consumo de sustrato |
| r _{ci} | Velocidad de consumo del componente i |
| r _{fi} | Velocidad de formación del componente i |

| | |
|-----------|--|
| r_s | Velocidad de consumo de sustrato |
| r_p | Velocidad de formación de producto |
| r_x | Velocidad de crecimiento de microorganismos |
| R | Constante universal de los gases |
| R_f | Relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa |
| RO_2 | Velocidad de transferencia de oxígeno |
| S | Concentración de sustrato |
| S_0 | Concentración de sustrato inicial |
| S_f | Concentración de sustrato final |
| t | Tiempo |
| t_r | Tiempo de retardo |
| T | Temperatura |
| μ | Velocidad específica de crecimiento del microorganismo |
| μ_m | Velocidad específica máxima de crecimiento del microorganismo |
| V | Volumen |
| ∇ | Disminución del número de microorganismos viables |
| X | Concentración de biomasa |
| X_0 | Concentración de biomasa inicial |
| $Y_{P/S}$ | Rendimiento en producto |
| $Y_{X/S}$ | Rendimiento en biomasa |

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| RESUMEN | II |
| ABSTRACT..... | IV |
| AGRADECIMIENTOS..... | VI |
| GLOSARIO..... | VIII |
| Lista de Figuras..... | VIII |
| Lista de Tablas..... | X |
| Lista de Ecuaciones | XII |
| Lista de Abreviaturas..... | XIV |
| Lista de Símbolos | XVI |
| ÍNDICE | XVIII |
| 1. PREFACIO..... | 1 |
| 1.1. Motivación del proyecto | 1 |
| 1.2. Antes del proyecto | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 2 |
| 2.1. Objetivo general | 2 |
| 2.2. Objetivos particulares | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3.1. Las biorrefinerías | 4 |
| 3.1.1. Definición de biorrefinería | 4 |
| 3.1.2. Biomasa | 7 |
| 3.1.3. Tipos de biorrefinerías..... | 8 |
| 3.1.4. Comparativa con las refinerías petroquímicas..... | 13 |
| 3.2. Microorganismos fermentativos | 17 |
| 3.2.1. Microorganismos de interés industrial..... | 18 |
| 3.2.2. Requerimientos nutricionales..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3. Bacterias del ácido acético: <i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i> | 22 |
| 3.2.3.1. <i>Gluconobacter oxydans</i> | 24 |
| 3.2.4. Crecimiento microbiano..... | 25 |
| 3.2.4.1. Estequiometría del crecimiento microbiano | 25 |
| 3.2.4.2. Cinética del crecimiento microbiano..... | 26 |
| 3.3. El Ácido 2-metil-3-hidroxiopropanoico | 31 |
| 3.3.1. Obtención del ácido 2-metil-3-hidroxiopropanoico | 31 |
| 3.3.1.1. Métodos químicos..... | 31 |
| 3.3.1.2. Métodos biológicos | 32 |
| 3.4. Biorreactores o fermentadores | 33 |
| 3.4.1. Sistemas de cultivo | 36 |
| 3.4.2. Parámetros de control | 39 |
| 3.4.3. Escalado | 40 |
| 3.4.4. Medio de fermentación | 41 |
| 3.4.5. Esterilización | 44 |
| 4. METODOLOGÍA Y MATERIALES | 48 |
| 4.1. Descripción general del proceso experimental | 48 |
| 4.2. Caracterización del microorganismo | 50 |
| 4.2.1. Medida del crecimiento microbiano | 51 |
| 4.2.1.1. Densidad óptica | 51 |
| 4.2.1.2. Relación entre densidad óptica y número de células..... | 52 |
| 4.3. Medios de cultivo y fermentación | 54 |
| 4.3.1. Medio de cultivo | 54 |
| 4.3.2. Medio de fermentación | 54 |
| 4.4. Descripción de los procesos fermentativos | 55 |
| 4.5. Separación y purificación del producto..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.1. Extracción líquido-líquido..... | 56 |
| 4.5.2. Evaporación | 58 |
| 4.6. Caracterización del producto..... | 59 |
| 4.6.1. Cromatografía de capa fina..... | 59 |
| 4.6.2. FTIR..... | 61 |
| 4.6.3. RMN..... | 64 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 67 |
| 6. CONCLUSIONES | 83 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 84 |

1. PREFACIO

1.1. Motivación del proyecto

El ácido metacrílico (MA) y el metacrilato de metilo (MMA) son de los monómeros más importantes para una amplia gama de productos poliméricos. El principal producto es el polimetilmetacrilato (PMMA), con un consumo cerca de los 2,1 millones de toneladas. Aproximadamente el 80% de la producción mundial del metacrilato de metilo se obtiene mediante el proceso de la acetona-cianohidrina (ACH), en el que la acetona y el cianuro de hidrógeno se hacen reaccionar con ácido sulfúrico concentrado en exceso, por ello, existen serios problemas con esta ruta debido al uso de materias primas altamente tóxicas, al alto coste del proceso y a la formación de cantidades significativas de subproductos que tienen que ser eliminados.

Se calcula que el proceso ACH produce unas emisiones de 5,5 kg de CO₂/kg de MMA, que son mucho mayores que la de otros *building blocks* poliméricos como pueden ser el propileno (1,1 kg CO₂/kg), el etileno (1,1 kg CO₂/kg) y el cloruro de vinilo (1,5 kg CO₂/kg). Por lo tanto, cabe esperar que una nueva ruta más ecológica para la síntesis del MMA, como la que se presenta en este proyecto, sea altamente beneficiosa para el medio ambiente.

1.2. Antes del proyecto

Este proyecto proporciona una ruta alternativa más verde y sostenible (*green chemistry*) para la síntesis de ácido metacrílico a partir de 2-metil-1,3-propanodiol, un subproducto industrial de bajo coste, mediante su oxidación parcial con el uso de la bacteria *Gluconobacter oxydans*.

Por lo que se producirá a escala piloto en el laboratorio una sustancia con gran importancia en el sector plástico y farmacéutico, con un menor impacto para el medio ambiente, ya que todas las reacciones se realizaron en medio acuoso y con el uso de bacterias no patógenas, sin usar disolventes orgánicos, y no se requirió separación y/o pretratamiento debido al alto rendimiento del producto en cada paso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo principal de este proyecto es el uso de la bacteria *Gluconobacter oxydans* para la obtención de una cantidad significativa de un *bulding block* interesante para la industria, en concreto, el ácido 2-metil-3-hidroxiopropanoico precursor del ácido metacrílico, en el laboratorio, a partir de 2-metil-1,3-propanodiol, usado como sustrato, para realizar su oxidación incompleta mediante fermentación bacteriana.

2.2. Objetivos particulares

Para poder cumplir con el objetivo general, se han fijado una serie de objetivos particulares para la comprobación y experimentación del proyecto:

- Utilización de diversas bacterias en la fermentación, así como variantes del género *Gluconobacter*.
- Uso de varios tipos de polialcoholes como sustratos en las fermentaciones.
- Preparación y cambios de composición de medio de cultivo y medio de fermentación.
- Realización de la fermentación a escala laboratorio.
- Separación del producto obtenido.
- Caracterización del producto obtenido.

3. INTRODUCCIÓN

La producción de productos químicos con base biológica no es algo nuevo, pero es algo que está cobrando mayor importancia en estos últimos años. Se calcula que la producción mundial actual de productos químicos con base biológica y polímeros (excluyendo los biocombustibles) es de alrededor de 50 millones de toneladas, y se espera un fuerte crecimiento en los próximos años.

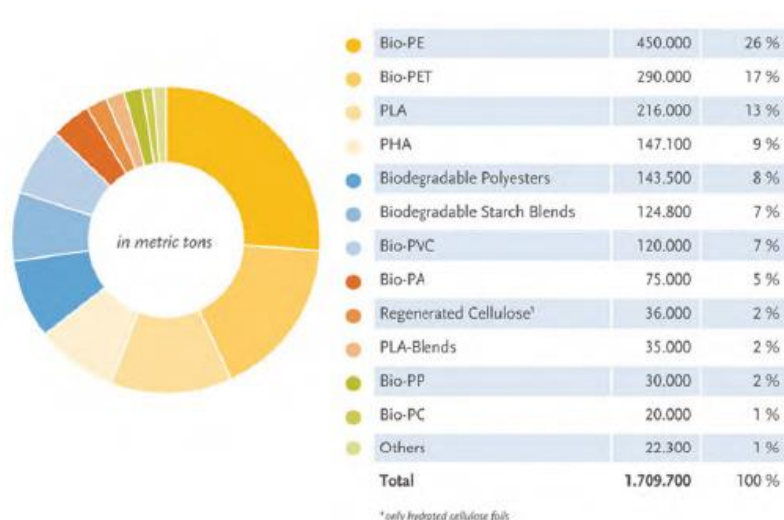


Figura 1. Capacidad de producción de biopolímeros en Europa (ton/año) en 2015

Sin embargo, la mayoría de los productos químicos y polímeros orgánicos todavía proceden de materias primas basadas en fuentes fósiles, mayormente del petróleo y el gas. Las aplicaciones no energéticas representan alrededor del 9% del consumo de combustibles fósiles (petróleo, gas, carbón) y del 16% de los productos petrolíferos.

La producción petroquímica global de productos químicos y polímeros se estima en alrededor de 330 millones de toneladas. Esta producción está dominada por un pequeño número de *building blocks* como son el metanol, el etileno, el propileno, el butadieno, el benceno, el tolueno y el xileno. Estos *building blocks* se convierten principalmente en polímeros y plásticos, pero también en un gran número de productos de la química fina y otras especialidades con funciones y características específicas.

Desde un punto de vista técnico, casi todos los materiales industriales producidos a partir de recursos fósiles podrían ser sustituidos por sus homólogos biológicos. Sin embargo, en muchos casos, el coste de la producción basada en la biomasa excede al coste su producción por vía petroquímica. Por ello, se debe demostrar que los nuevos productos tienen un rendimiento al menos tan bueno como su equivalente petroquímico y que tendrán un menor impacto ambiental.

3.1. Las biorrefinerías

En los últimos años, se han tomado medidas sustanciales en la transición hacia una economía basada en productos de base biológica. Nuevos bioproductos comercializables están reemplazando a sus respectivos productos obtenidos de fuentes fósiles y se están reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero. Mientras que las perspectivas económicas se desarrollan apoyadas por políticas innovadoras, las fluctuaciones de los precios, tanto del petróleo como de las materias primas usadas como biomasa, y de la demanda, exigen que los sistemas utilizados sean robustos y competitivos a largo plazo. El avance hacia una futura economía basada en el uso innovador y rentable de la biomasa para la producción de productos biológicos y bioenergía debe ser impulsada por sistemas de biorrefinería integrados y bien desarrollados.

3.1.1. Definición de biorrefinería

La Agencia Internacional de Energía (IEA) define la biorrefinería como: *“el procesamiento sostenible de la biomasa en un espectro de productos comercializables y energía”*. Esto significa que la biorrefinería puede ser una instalación, un proceso, una planta o incluso un conjunto de instalaciones.

Un factor principal para el establecimiento de las biorrefinerías es el aspecto de la sostenibilidad. Todas las biorrefinerías deben ser evaluadas para toda la cadena de valor sobre su sostenibilidad ambiental, económica y social durante todo su ciclo de vida (construcción, operación y desmantelamiento). Esta evaluación también debe tener en cuenta las posibles consecuencias debidas a la competencia por los recursos

alimentarios y de biomasa, el impacto en el uso y la calidad del agua, los cambios en el uso de la tierra, los gases de efecto invernadero, los posibles riesgos toxicológicos y la eficiencia energética. Dado que la evaluación de la sostenibilidad no es un número absoluto, se suele realizar la comparación con los sistemas convencionales que proporcionan los mismos productos y servicios.

Una etapa importante del proceso es la provisión de un suministro renovable, consistente y regular de materias primas. Una biorrefinería, puede utilizar diversos tipos de biomasa procedentes de la silvicultura, la agricultura, la acuicultura, incluso los residuos de la industria y de los hogares, incluyendo la madera, los cultivos agrícolas, los residuos orgánicos (tanto vegetales como los derivados de animales), los residuos forestales y la biomasa acuática.

El objetivo del proceso tecnológico en la biorrefinería es despolimerizar y desoxigenar los componentes de la biomasa, con el fin de convertir las materias primas en productos valiosos, para ello se aplican conjuntamente varios procesos, que se pueden dividir en cuatro grupos principales: procesos termoquímicos, bioquímicos, mecánicos/físicos y químicos.

- **Procesos termoquímicos:** estos procesos implican una descomposición térmica de los componentes de la biomasa y una liberación de energía en forma de calor u obtención de biocombustibles intermedios. Hay dos procesos termoquímicos principales que transforman la biomasa lignocelulósica en energía y productos químicos asociados a las instalaciones de biorrefinerías: la gasificación y la pirólisis.
- **Procesos bioquímicos:** a diferencia de los anteriores, ocurren a temperaturas y velocidades bajas y se producen gracias a la acción de microorganismos y/o enzimas específicas que degradan el sustrato fermentable de la biomasa. Mediante fermentación pueden transformarse aquellas materias primas que contienen un gran porcentaje de carbohidratos, bien en forma simple o bien en forma de polímeros de almidón o polisacáridos de celulosa y hemicelulosa. En la fermentación aeróbica, uno de los principales productos obtenidos es el bioetanol, pero además, es posible producir una gran variedad de productos que

son especialmente interesantes en la industria: xilitol, ácido succínico, ácido itacónico, lisina, 1,3-propanodiol, etc. El otro proceso bioquímico, la digestión anaeróbica, ocurre en ausencia de oxígeno y la biomasa se descompone en una suspensión acuosa de productos sólidos y productos gaseosos conocidos como biogás, usado para electricidad o energía térmica. Este proceso de transformación puede aplicarse sobre cualquier tipo de biomasa, especialmente en aquellas con un alto contenido en humedad.

El número de building blocks químicos accesibles a través de la fermentación es considerable, y por ello, este proceso se ha utilizado ampliamente en la ingeniería química. Hoy en día, se producen alrededor de ocho millones de toneladas al año de productos de fermentación.

- Procesos mecánicos: son procesos que no cambian el estado o la composición de la biomasa, sino que sólo se produce una reducción de tamaño para la adaptación de la materia prima a los requisitos de la instalación o una separación de los componentes y la extracción de los compuestos de interés industrial.
- Procesos químicos: son aquellos que suponen una modificación en la estructura química de la molécula por reacción con otras sustancias, siendo los procesos más comunes la hidrólisis y la transesterificación.

Los productos obtenidos de la biorrefinería se pueden agrupar en dos grandes grupos: productos materiales y productos energéticos, y deben de ser capaces de reemplazar a los productos basados en combustibles fósiles procedentes de refinerías de petróleo. Los productos materiales más importantes son los químicos, los ácidos orgánicos, los polímeros y resinas, los biomateriales, los alimentos y piensos, y los fertilizantes. Mientras que los productos energéticos, se centran principalmente en los biocombustibles y en la energía y/o calor.

La producción de bioproductos es un mercado en constante expansión con aplicaciones en la industria farmacéutica, química, papelera y alimentaria, pero precisa aún de un

desarrollo tecnológico que permita obtener estos productos a un coste menor y de una manera más eficiente.

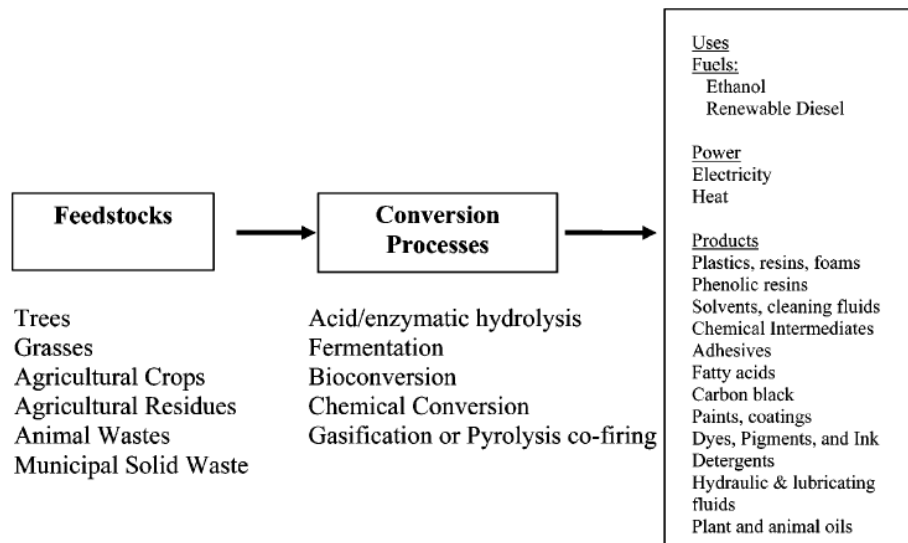


Figura 2. Diagrama de flujo de una biorrefinería

3.1.2. Biomasa

La biomasa fue la principal fuente de energía hasta el siglo XIX, sin embargo, el uso de este combustible con la revolución industrial fue menguando progresivamente, comenzando la era de los combustibles fósiles. Hoy en día, el aumento de su precio, los problemas medioambientales ocasionados por su uso y sus reservas limitadas, ha hecho iniciar una nueva actividad económica más sostenible, emergiendo así una economía basada en la biomasa.

En general, la biomasa está constituida por un 95% de carbohidratos, lignina, grasas y proteínas, el otro 5% lo forman las vitaminas, colorantes, aromatizantes y otras pequeñas moléculas, los cuales pueden obtenerse a través de diferentes rutas de transformación, extracción y/o fraccionamiento, algunas de las cuales aún se encuentran en fase de investigación.

Además, alrededor del 85% de los productos químicos pueden elaborarse a partir de únicamente 20 productos químicos base o *building blocks*. Es por ello que es posible generar productos químicos tanto de la biomasa como del petróleo ya que ambos presentan composiciones químicas parecidas.

Tabla 1. Perspectivas de futuro para las tecnologías basadas en la biomasa (BRDA, 2000)

| Cuota de producción a partir de la biomasa (%) | 2002 | 2010 | 2020 | 2030 |
|--|------|------|------|------|
| Generación de energía | 2.8 | 4 | 5 | 5 |
| Biocombustible para transporte | 0.5 | 4 | 10 | 20 |
| Bioproductos | 8 | 12 | 18 | 25 |

3.1.3. Tipos de biorrefinerías

En función de los productos deseados, una biorrefinería tratará de dirigir los procesos de transformación de la biomasa hacia el tipo de tecnologías más conveniente. Así, se distinguen dos tipos de biorrefinerías: aquellas que buscan la producción energética y llevan a cabo una valorización posterior de las sustancias que no pueden ser aprovechadas energéticamente o que son generadas como residuos del proceso, y aquellas que dirigen su producción hacia la extracción de compuestos de alto valor añadido y emplean los residuos/subproductos generados como fuente de energía (biocombustibles, electricidad y/o calor).

De forma general, el primer paso en las biorrefinerías implica la separación de cada una de las fracciones de la biomasa, para posteriormente desarrollar procesos más específicos que permitan su conversión en biocombustibles, productos químicos plataforma (*building blocks*) y productos químicos finales de elevado valor añadido.

3.1.3.1. Biorrefinería de material lignocelulósico

Este tipo de biorrefinerías, se corresponde con la valorización de los componentes de la biomasa lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina) a través de procesos termoquímicos y bioquímicos, siendo el sector forestal el que mejor puede adaptar en sus instalaciones este tipo de procesos y en especial las industrias papeleras.

Las principales barreras que dificultan a día de hoy el establecimiento de este tipo de biorrefinerías son fundamentalmente tecnológicas, sobre todo en lo concerniente al fraccionamiento de los componentes de la biomasa y el pretratamiento necesario para

el aprovechamiento de la lignina y celulosa. De hecho, esta etapa es una de las más costosas y menos desarrolladas dado que la heterogeneidad de la biomasa hace que no exista un pretratamiento válido para todas ellas. Hoy en día, la valorización que se lleva a cabo con los residuos generados en la fabricación de papel es el aprovechamiento energético de las lejías negras, procedentes del lavado de la pasta.

El desarrollo tecnológico permitirá la obtención de una gran variedad de productos industriales a partir de la celulosa y lignina contenidas en el *tall oil*, lejías negras y residuos forestales, pudiéndose integrar a la instalación los procesos de gasificación, pirólisis y fermentación para dar lugar a bioetanol, biomateriales, productos alimenticios y productos químicos, tales como adhesivos, dispersantes, pinturas, fármacos, textiles, etc.

3.1.3.2. Biorrefinería de material cereal

Este concepto de biorrefinería en la actualidad se corresponde con las plantas de etanol que utilizan materias primas con alto contenido en almidón como son el maíz, la cebada y el trigo. Dichas plantas generan una serie de subproductos que pueden ser aprovechados con diversos fines, entre los que se encuentran los *DDG*, que por sus características alimenticias y su alto contenido en fibra vegetal, se utilizan como complemento alimenticio para el ganado. También, se pueden obtener otros coproductos como harinas, jarabe de maíz de alta concentración de fructosa, almidón, dextrosa, etc., los cuales pueden seguir rutas de procesamiento para la obtención de productos alimenticios, plásticos, pegamentos, adhesivos, etc. La línea de productos podrá ampliarse cuando puedan aplicarse procesos termoquímicos y bioquímicos a la paja de cereal y al cañote de maíz, y así aprovechar el material lignocelulósico de la misma manera que ha sido descrito en las biorrefinerías de material lignocelulósico.

3.1.3.3. Biorrefinería de semillas oleaginosas

Estas instalaciones se corresponden con las plantas de biodiesel que utilizan como materias primas cultivos con alto contenido en aceite como la colza, girasol y soja. Como coproductos se obtiene la glicerina así como otros componentes con alto contenido en

proteína que se emplean para fines alimentarios. Por su parte, la glicerina puede utilizarse en los sectores farmacéutico, cosmético y químico para la fabricación de emulsiones, humectantes, jabones, plastificantes, resinas, lubricantes, etc.

Las futuras plantas de biodiesel se adaptarán para la utilización de materias primas no empleadas en la industria alimentaria (como la jatropha y la palma africana), cuya fracción lignocelulósica puede ser utilizada también para producir biogás. Asimismo, se espera además un desarrollo tecnológico que posibilite la extracción de productos químicos con un valor añadido a partir de glicerina vía conversión química y fermentación.

3.1.3.4. Biorrefinería verde

Las biorrefinerías verdes son sistemas que tratan sus fracciones y productos de acuerdo con la naturaleza de su biomasa. Las materias primas incluidas en este concepto de biorrefinería se corresponden a las biomásas con alto contenido en humedad tales como pastos y cultivos verdes (alfalfa y trébol) y los cereales en fase temprana de desarrollo así como otros cultivos como la patata, la yuca, la remolacha azucarera y la caña de azúcar. El sector más característico en el que se puede aplicar este tipo de concepto es la industria azucarera, en la cual durante el proceso industrial se generan dos líneas de productos: el jugo de prensado o jugo verde y la torta prensada.

El jugo de prensado o verde contiene una gran variedad de sustancias (proteínas, aminoácidos libres, ácidos orgánicos, tintes, enzimas, hormonas, otras sustancias orgánicas, minerales, etc.), y a partir de él puede llegar a obtenerse ácido láctico y sus derivados, aminoácidos, etanol y ciertas proteínas. La torta, rica en nutrientes, suele destinarse a la alimentación animal aunque también puede emplearse para la producción de ácido levulínico y biocombustibles sintéticos (gas de síntesis e hidrocarburos) y pellets. Asimismo, estos procesos dan lugar a diferentes residuos que pueden emplearse para la obtención de biogás, en combinación con la producción de calor y electricidad.

3.1.3.5. Biorrefinería marina

La producción global neta de biomasa primaria se divide igualmente entre los sistemas terrestres y acuáticos. Hasta ahora, las políticas se han centrado principalmente en la biomasa terrestre, mientras que las fuentes marinas como las microalgas (algas diatomeas: verdes, doradas, verdeazuladas) y las macroalgas (algas marrones, rojas y verdes) y sus productos derivados tienen un gran potencial que aún no se conoce ni se explota completamente.

Las diatomeas son la forma de vida dominante del fitoplancton, probablemente representan el mayor potencial de biomasa de la tierra, cubriendo aproximadamente cien mil especies que a menudo acumulan aceites. Las algas pueden, dependiendo de las especies y de las condiciones de crecimiento, acumular cantidades significativas de aceites, carbohidratos, almidón y vitaminas.

Los cultivos marinos han sido reconocidos desde hace mucho tiempo por su potencial de reducción de gases de efecto invernadero, su capacidad para absorber dióxido de carbono posiblemente supera a la de algunas especies terrestres. Sin embargo, el coste de producción/recolección de la biomasa sigue siendo todavía demasiado alto como para ser una opción viable para la obtención de biocombustibles y productos químicos.

3.1.3.6. Biorrefinería termoquímica (Syngas)

El gas de síntesis (*syngas*) es una mezcla compuesta principalmente por monóxido de carbono e hidrógeno. Se produce sometiendo a la biomasa a temperaturas extremas (430°C) en presencia de oxígeno o aire en un proceso conocido como gasificación. Después de su limpieza, el gas de síntesis puede usarse para producir energía o puede convertirse en alcoholes, combustibles o productos químicos. También puede fermentar para dar metanol, etanol, amoníaco y otros componentes químicos.

Tabla 2. Resumen de los tipos de biorrefinerías en función de la materia prima utilizada (Fernando et al., 2006)

| Tipo | Biomasa utilizada | Tecnología utilizada | Fase de desarrollo |
|----------------------------------|---|--|------------------------|
| Biorefinería verde | Biomasa húmeda: pastos y cultivos verdes | Pretratamiento, prensado, fraccionado, separación y digestión | Planta piloto (en I+D) |
| Biorefinería de cultivo completo | Cultivos completos | Molido seco o húmedo, conversión bioquímica | Planta piloto |
| Biorefinería lignocelulósica | Madera, residuos agrícolas, cultivos energéticos y residuos municipales | Pretratamiento, hidrólisis química y enzimática, fermentación, separación | I+D Planta piloto |
| Biorefinería de dos plataformas | Todo tipo de biomasa | Extracción y separación | Planta piloto |
| Biorefinería marina | Biomasa acuática: micro y macroalgas | Extracción y separación | I+D, Planta piloto |
| Biorefinería termoquímica | Todo tipo de biomasa | Conversión termoquímica, torrefacción, pirólisis, gasificación, separación de productos, síntesis catalítica | Planta Piloto, I+D |

En la actualidad, la investigación está avanzando y existen muchas plantas demostrativas que tratan de optimizar los procesos y adecuar las tecnologías a la heterogeneidad de la biomasa. En Europa, destaca la trayectoria de los países escandinavos, los cuales están trabajando sobre todo en torno al desarrollo de biorrefinerías de tipo forestal, mientras que en EEUU, la investigación se dirige sobre todo hacia las biorrefinerías de tipo cereal para la producción de ácido poliláctico a partir del maíz. Brasil, por su gran desarrollo en plantas de bioetanol con caña de azúcar, está desarrollando iniciativas para la mejora tecnológica de los procesos de valorización de la caña de azúcar.

Así, los beneficios económicos, medioambientales y sociales atribuidos a las biorrefinerías son muy amplios y diversos:

- Beneficios económicos:
 - Proporciona un valor añadido al recurso de la biomasa por la posibilidad de aprovechamiento integral de todos sus componentes.
 - Mejora la rentabilidad de las instalaciones mediante el aprovechamiento de los subproductos generados.

- Contribuye a mejorar la competitividad de diversos sectores industriales a través de la innovación: industria química, industria forestal, farmacéutica, etc.
 - Ayuda a crear puestos de trabajo asociados tanto a los procesos de transformación como a los procesos de recolección, pretratamiento y transporte de la biomasa.
 - Emplea un recurso autóctono disminuyendo así la dependencia hacia los combustibles fósiles.
- Beneficios medioambientales:
 - Se reducen las emisiones asociadas al transporte de la materia prima gracias al empleo de la materia prima procedente de la misma instalación o de un recurso generado en zonas próximas.
 - Se reduce el fuerte impacto de la extracción de petróleo así como las emisiones de gases de efecto invernadero y otros gases contaminantes a la atmósfera durante la quema de combustible fósil.
 - Beneficios sociales:
 - Se fortalece el medio rural a través de la creación de actividades económicas que generan empleo y diversifican el sistema productivo.
 - Mejora de los servicios e infraestructuras en zonas rurales como consecuencia de la creación de estas actividades económicas.

Un enfoque actual muy prometedor para reducir los costes de producción es utilizar las llamadas *biofuel-driven biorefineries* para la coproducción de productos de valor añadido (productos químicos, materiales, alimentos, piensos) y biocombustibles a partir de recursos procedentes de la biomasa en un enfoque integrado muy eficiente.

3.1.4. Comparativa con las refinerías petroquímicas

La producción de productos químicos con base biológica puede generar entre diez mil y quince mil millones de dólares de ingresos para la industria química mundial. En el 2004,

el Departamento de Energía de los Estados Unidos publicó un informe en el que se enumeraban 12 sustancias químicas que consideraba como potenciales *building blocks* para el futuro. Esta lista fue revisada y actualizada en 2010 y se encuentra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Potenciales building blocks (Departamento de Energía de EE.UU., 2010)

Bio-based chemical opportunities

| 2004 | 2010 |
|---|---------------------------------------|
| <i>1,4-Dicarboxylic acids (succinic, fumaric and malic)</i> | <i>Succinic acid</i> |
| <i>2,5-Furan dicarboxylic acid</i> | <i>Furanics</i> |
| <i>3-Hydroxy-propionic acid</i> | <i>Hydroxypropionic acid/aldehyde</i> |
| <i>Glycerol</i> | <i>Glycerol and derivatives</i> |
| <i>Sorbitol</i> | <i>Sorbitol</i> |
| <i>Xylitol/Arabinitol</i> | <i>Xylitol</i> |
| <i>Levulinic acid</i> | <i>Levulinic acid</i> |
| <i>Aspartic acid</i> | - |
| <i>Glucaric acid</i> | - |
| <i>Glutamic acid</i> | - |
| <i>Itaconic acid</i> | - |
| <i>3-hydroxybutyrolactone</i> | - |
| - | <i>Biohydrocarbons</i> |
| - | <i>Lactic acid</i> |
| - | <i>Ethanol</i> |

Se suele hacer una comparación entre las refinerías petroquímicas tradicionales y las biorrefinerías. La siguiente tabla ofrece una visión general de las principales similitudes y diferencias entre las refinerías petroquímicas y las biorrefinerías.

Tabla 4. Principales similitudes y diferencias entre las refinerías petroquímicas y las biorrefinerías

| | Refinery | Biorefinery |
|---|--|---|
| Feedstock | Feedstock relatively homogeneous Low in oxygen content The weight of the product (mole/mole) generally increases with processing Some sulfur present Sometimes high in sulfur | Feedstock heterogeneous regarding bulk components e.g., carbohydrates, lignin, proteins, oils, extractives, and/or ash Most of the starting material present in polymeric form (cellulose, starch, proteins, lignin) High in oxygen content The weight of the product (mole/mole) generally decreases with processing It is important to perceive the functionality in the starting material Low sulfur content Sometimes high in inorganics, especially silica |
| Building block composition | Main building blocks: Ethylene, propylene, methane, benzene, toluene, xylene isomers. | Main building blocks: Glucose, xylose, fatty acids (e.g., oleic, stearic, sebacic) |
| (Bio)chemical processes | Almost exclusively chemical processes Introduction of heteroatoms (O, N, S) Relative homogeneous processes to arrive to building blocks: Steam cracking, catalytic reforming Wide range of conversion chemistries | Combination of chemical and biotechnological processes Removal of oxygen Relative heterogeneous processes to arrive to building blocks Smaller range of conversion chemistries: Dehydration, hydrogenation, fermentation |
| Chemical intermediates produced at commercial scale | Many | Few but increasing (e.g., ethanol, furfural, biodiesel, mono-ethanolglycol, lactic acid, succinic acid, ...) |

Por tanto, las biorrefinerías crean una cadena de proceso que añade la biomasa como recurso alternativo al carbón, al petróleo o al gas natural para crear intermedios base C2, C3 o C4 de los que se hablará a continuación. En principio, los recursos fósiles y los renovables pueden sustituirse mutuamente e, históricamente, ya han ocurrido otras sustituciones cambiando el carbón por el petróleo y el gas natural.

3.1.4.1. C2 Building Blocks

Como sustrato, en la biotecnología se suele utilizar la glucosa. Esta, a partir de una fermentación alcohólica se desintegra obteniéndose como producto principal etanol, que es el intermedio base C2 más importante. Este bioetanol se puede usar, o bien como biocombustible, o bien deshidratarse con un catalizador de Al_2O_3MgO o zeolita dando lugar al etileno. Este bioetileno es una fuente alternativa a la que se obtiene en la

pirolisis, al aplicar vapor de agua y altas temperaturas a las fracciones ligeras del petróleo (GLP, nafta y gasoil).

3.1.4.2. C3 Building Blocks

A partir de materias primas renovables se puede acceder a los intermedios base C3 tanto por rutas químicas como por rutas bioquímicas (Figura 3). Destaca la producción de combustibles para automóviles a partir de aceites vegetales y grasas animales donde se forma el propano como coproducto. Otra forma para obtener el biopropileno y el biopropano es la deshidratación e hidrogenación del glicerol, obtenido por fermentación de la biomasa. También, a través de la fermentación de azúcares para producir bioetanol, deshidratándolo a bioetileno, dimerizándolo para obtener butenos, y por último haciéndolo reaccionar con bioetileno para llegar al biopropileno.

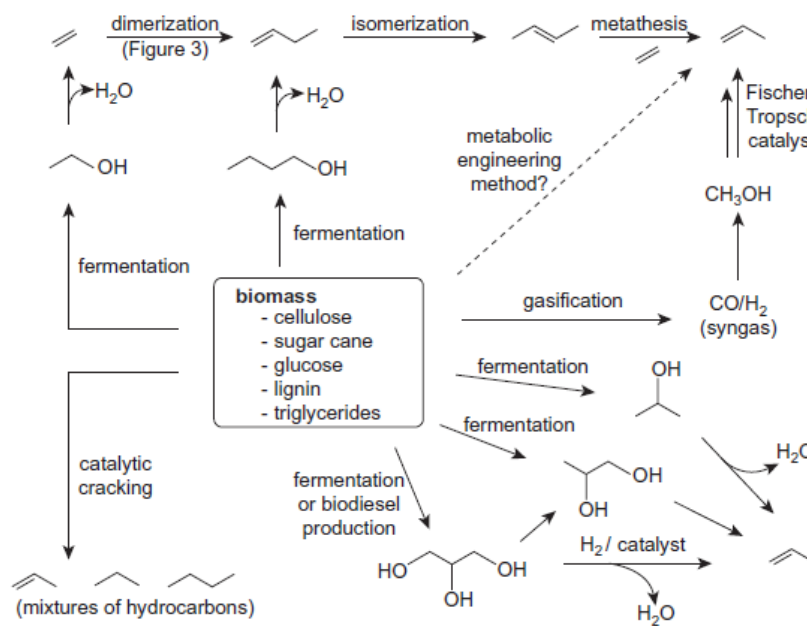


Figura 3. Diferentes rutas químicas y bioquímicas para la obtención de intermedios base C3

En definitiva, hay muchas alternativas para obtener el biopropileno, que es uno de los intermedios químicos con más demanda, a partir de fuentes renovables, ya que con él se puede llegar a obtener una serie de productos muy diversos: disolventes, polímeros, cosméticos, fármacos, etc.

Otro intermedio base muy importante y demandado es el ácido láctico, que es sintetizable por dos vías: la fermentación de carbohidratos o la conversión química a partir de glicerol. Este ácido da lugar al ácido acrílico mediante su deshidratación, y puede ser reducido a 1,2-propanodiol o puede usarse como precursor del ácido poliláctico (PLA).

3.1.4.3. C4 Building Blocks

Los intermedios base C4 son accesibles utilizando como materias primas el bagazo de maíz o la caña de azúcar mediante la fermentación con acetona-butanol o acetona-butanol-etanol (ABE) y el uso de las bacterias *Clostridium acetobutylicum* o *Clostridium beijerinckii* bajo condiciones anaeróbicas. Recientemente, se han modificado genéticamente *Escherichia coli* para producir alcoholes de cadenas superiores a partir de glucosa, incluyendo el 1-butanol, 2-metil-1-butanol, y particularmente el isobutanol. La deshidratación ácida catalizada convierte el isobutanol en una mezcla de olefinas C4 (1-butenos, cis-2-butenos, trans-2-butenos e isobutenos) que tras un proceso de deshidratación se convierten en una mezcla de isobuteno que no ha reaccionado y 1,3-butadieno.

Estos intermedios base C4 basados en carbohidratos no solo sustituyen a los productos derivados del petróleo, si no que complementan y proporcionan nuevas oportunidades para los polímeros basados en C4. Es el caso del ácido succínico (ácido butanodioico) cuya mayor salida es su conversión en 1,4-butanodiol.

3.2. Microorganismos fermentativos

Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempo inmemorial. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían desde que inventó, o descubrió al azar, la manera de hacer cerveza, vinagre, vino o pan. La cerveza era conocida antes del 6000 a.C. por sumerios y babilonios, y en el antiguo Egipto existía ya verdadera producción en 1700 a.C., el vinagre se producía desde antes de esa fecha y el vino es también muy

antiguo, ya que existe evidencia de su producción antes del 2000 a.C. en Egipto y China, y finalmente el pan se conoce desde 4000 a.C. aproximadamente.

Se puede afirmar que hasta comienzos del siglo XX existe muy poco o ningún control de los procedimientos utilizados para la elaboración de esos productos. Es a partir de ahí cuando comienza la etapa de producción de una serie de productos nuevos que se suman a los conocidos desde la antigüedad, como productos farmacéuticos, enzimas, aditivos alimentarios, productos químicos, etc.

Hasta el 1945, solamente unos pocos productos eran fabricados con microorganismos, y además, varios de esos productos podían obtenerse por otras vías, más convenientes por razones económicas, como el etanol, el ácido láctico, la acetona o el butanol.

Como consecuencia de los avances logrados con los años, se logró la aparición de un gran número de nuevos productos, como antibióticos, aminoácidos, esteroides, enzimas, biomasa aplicada a la alimentación animal y humana, nucleótidos, diversos productos químicos, etc.

Actualmente, vivimos en el mundo de la biotecnología, que utiliza con frecuencia microorganismos modificados genéticamente para sintetizar productos de muy elevado valor comercial.

3.2.1. Microorganismos de interés industrial

Un microorganismo para que pueda utilizarse en un proceso industrial, aparte de ser capaz de producir la sustancia de interés de forma rentable, debe de tener entre otras características:

- Ser capaz de crecer rápidamente y sintetizar el producto deseado en un cultivo a gran escala y en un período relativamente corto de tiempo.
- Tiene que poder crecer en un medio de cultivo líquido relativamente barato que se comercialice a granel. Muchos procesos industriales utilizan subproductos provenientes de otras industrias como sustratos principales o suplementarios de los medios de cultivo a gran escala.

- Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares
- No debe ser patógeno, especialmente para los seres humanos, pero tampoco para animales o plantas.
- Debe ser susceptible de manipulación genética, para incrementar su rendimiento mediante mutación y selección.

El término microorganismos incluye organismos microscópicos unicelulares y los virus, que son microscópicos pero sin estructura celular, pero estos últimos solo suelen usarse en la producción de fármacos.

Los microorganismos son diferentes de las células de los organismos visibles. Las células de los macroorganismos, como las de los animales o las plantas, son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza y existen solamente como partes de los órganos de los animales o de las partes de las plantas. Por el contrario, la mayoría de los microorganismos pueden llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción de un modo independiente de otras células, por ello son los adecuados para procesos industriales.

Los principales microorganismos utilizados industrialmente son los hongos (levaduras y mohos) y algunos procariotas, que a diferencia de las células eucariotas, no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos (arqueas, pero principalmente bacterias).

- Hongos: son un grupo de microorganismos eucariotas, la mayoría crecen en forma de filamentos multicelulares denominados hifas. Las levaduras, por el contrario, son organismos unicelulares y con gran importancia industrial, en la fabricación de pan, vino y cerveza, concretamente la más utilizada la *Saccharomyces cerevisiae*. Hoy en día, se utilizan en muchas otras fermentaciones como la producción de biocombustibles o fármacos.
- Arqueas: estos microorganismos son diferentes de las bacterias ya que tienen ciertas características que los hacen más parecidos a las células

eucarióticas. La mayoría de ellos viven en condiciones extremas, son los denominados extremófilos. Se pueden clasificar según su fisiología en: halófilos (adaptados a altas concentraciones de sal), termófilos (adaptados a altas temperaturas), alcalófilos (adaptados medios alcalinos) y acidófilos (adaptados a medios ácidos). Se utilizan pocas arqueas a nivel industrial, algunas son fuente de enzimas que funcionan en condiciones extremas, las más utilizadas son las metanógenas para el tratamiento de residuos y la producción de biogás.

- Bacterias: las bacterias son microorganismos procariontes que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Son capaces de degradar determinada materia orgánica y diversos sustratos, incluso hidrocarburos, dando lugar a un gran número de productos químicos de interés industrial.

Tabla 5. Microorganismos de interés industrial

| Archaeans | Eubacteria | | Fungi | |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | Gram-negative | Gram-positive | Filamentous | Yeasts |
| <i>Methanobacterium</i> | <i>Acetobacter</i> | <i>Actinomyces</i> | <i>Acremonium</i> | <i>Blakeslea</i> |
| <i>Methanococcus</i> | <i>Acinetobacter</i> | <i>Actinoplanes</i> | <i>Agaricus</i> | <i>Candida</i> |
| <i>Pyrococcus</i> | <i>Agrobacterium</i> | <i>Arthrobacter</i> | <i>Aureobasidium</i> | <i>Hansenula</i> |
| <i>Sulfolobus</i> | <i>Alcaligenes</i> | <i>Bacillus</i> | <i>Aspergillus</i> | <i>Kluyveromyces</i> |
| | <i>Azotobacter</i> | <i>Brevibacterium</i> | <i>Claviceps</i> | <i>Pachysolen</i> |
| | <i>Erwinia</i> | <i>Clostridium</i> | <i>Coniothyrium</i> | <i>Phaffia</i> |
| | <i>Escherichia</i> | <i>Corynebacterium</i> | <i>Curularia</i> | <i>Pichia</i> |
| | <i>Klebsiella</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Cylindrocarpon</i> | <i>Rhodotorula</i> |
| | <i>Methylococcus</i> | <i>Lactococcus</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Saccharomyces</i> |
| | <i>Methylophilus</i> | <i>Leuconostoc</i> | <i>Lentinus</i> | <i>Xanthophyllomyces</i> |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>Micrococcus</i> | <i>Mortierella</i> | <i>Yarrowia</i> |
| | <i>Ralstonia</i> | <i>Mycobacterium</i> | <i>Mucor</i> | <i>Zygosaccharomyces</i> |
| | <i>Salmonella</i> | <i>Nocardia</i> | <i>Paecilomyces</i> | |
| | <i>Sphingomonas</i> | <i>Propionibacterium</i> | <i>Penicillium</i> | |
| | <i>Spirulina</i> | <i>Streptococcus</i> | <i>Rhizomucor</i> | |
| | <i>Thermus</i> | <i>Streptomyces</i> | <i>Rhizopus</i> | |
| | <i>Thiobacillus</i> | | <i>Sclerotium</i> | |
| | <i>Xanthomonas</i> | | <i>Trametes</i> | |
| | <i>Zoogloea</i> | | <i>Trichoderma</i> | |
| | <i>Zymomonas</i> | | <i>Trichosporon</i> | |

3.2.2. Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO_2 como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Otro factor esencial, está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El O_2 es uno de los oxidantes más comunes en el metabolismo energético. En ausencia del O_2 , el NO_3^- o SO_4^{2-} son utilizados como aceptores de electrones por algunas bacterias. Las bacterias metanogénicas utilizan H_2 para reducir el CO_2 a CH_4 para obtener energía. Otros protistas obtienen su energía, en condiciones anaerobias por reacción de óxido-reducción realizadas sobre compuestos orgánicos. Las fuentes de carbono cumplen también el rol de ser fuente de energía.

Otro requerimiento nutricional, está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Para la síntesis de proteína se requieren en general L-aminoácidos, aunque también son necesarios algunos aminoácidos de la serie D como D-alanina y D-aspártico para su incorporación a la pared de las células.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el fósforo y el azufre, son suministrados en forma de HPO_4^{2-} y SO_4^{2-} (o aminoácidos azufrados). El fósforo se incorpora en ácidos nucleicos, y polímeros celulares. El azufre es asimilado para la síntesis de aminoácidos azufrados, y además se necesita para la biotina, coenzima A, tiamina y otros componentes.

Los requerimientos de potasio y magnesio son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al ARN de manera que los requerimientos de potasio aumentan con los factores que influyen en el aumento del ARN de las células, como la velocidad de crecimiento. El ion potasio actúa como coenzima y, probablemente, actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ion magnesio es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas

reacciones del metabolismo. Tanto el potasio como el magnesio se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen dos categorías: los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como: Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn, y los que son raramente esenciales como: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I. A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a estrés, como por ejemplo por aumento de temperatura por encima de un valor óptimo.

Los requerimientos de factores de crecimiento comprenden ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B como tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, niacina, etc., que representan para muchas bacterias y levaduras factores esenciales en los medios sin los cuales no se produce crecimiento celular. La mayor parte de las vitaminas son constituyentes de coenzimas. Otros factores de crecimiento son las purinas, poliaminas, putrescinas, etc.

En algunos procesos existe la necesidad de efectuar otros agregados, a parte de los nutrientes requeridos por los microorganismos y que representan los requerimientos específicos del proceso considerado.

3.2.3. Bacterias del ácido acético: *Acetobacter* y *Gluconobacter*

La producción de ácido acético a partir de etanol por parte de estas bacterias da nombre este grupo de bacterias. Las bacterias del ácido acético, son bacterias con metabolismo respiratorio aerobio y quimioorganótrofas, es decir, que utilizan compuestos orgánicos como donadores de electrones en su metabolismo energético.

El grupo de las bacterias del ácido acético incluye bacilos gramnegativos, aerobios y móviles que llevan a cabo la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares, lo que conlleva la acumulación de ácidos orgánicos como producto final. Son un grupo heterogéneo, los organismos con flagelos polares (en uno o varios extremos) se clasifican dentro del género *Gluconobacter* mientras que las que poseen flagelos

peritricos (muchos flagelos rodeando su contorno) se agrupan en el género *Acetobacter*. Además de la disposición de sus flagelos, las *Acetobacter* tienen la capacidad de oxidar posteriormente el ácido acético para generar CO₂, ya que poseen todas las enzimas para realizar el ciclo completo del ácido cítrico.

Las bacterias del ácido acético presentan una tolerancia relativamente elevada a entornos ácidos, la mayoría de las cepas pueden crecer sin problemas a valores de pH inferiores a 5. Esta tolerancia a la acidez es, por supuesto, esencial para un organismo que produce gran cantidad de ácidos.

Las bacterias del ácido acético se encuentran habitualmente en bebidas alcohólicas, se aíslan a menudo de las derivadas de la fruta como la sidra y el vino, pero también de la cerveza. Las colonias de bacterias del ácido acético se reconocen en placas de agar con CaCO₃ que contengan etanol, porque el ácido acético que producen disuelve el CaCO₃ que de por sí es insoluble y se produce un aclaramiento en la placa como se muestra en la figura.

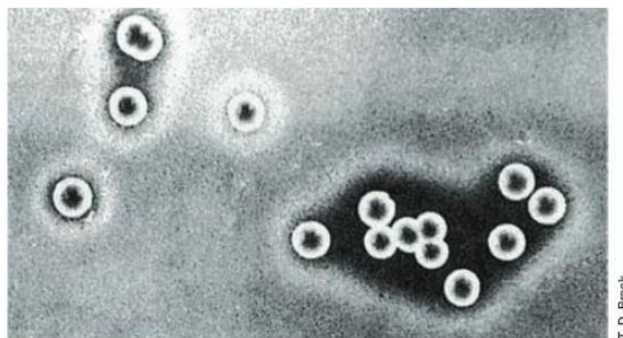


Figura 4. Colonias de Acetobacter crecidas en agar con carbonato de calcio que contiene etanol como fuente de energía

Además de etanol, las bacterias del ácido acético llevan a cabo la oxidación incompleta de compuestos orgánicos como alcoholes de cadena larga y azúcares. Por ejemplo, la glucosa es oxidada sólo hasta ácido glucónico, la galactosa hasta ácido galactónico y así sucesivamente. Esta característica "suboxidante" se aprovecha también en la producción del ácido ascórbico (vitamina C). El ácido ascórbico puede formarse a partir de sorbosa pero la síntesis química de la sorbosa es difícil de conseguir. Sin embargo puede obtenerse muy fácilmente usando las bacterias del ácido acético, que oxidan sorbitol hasta sorbosa, en un proceso denominado biotransformación.

3.2.3.1. *Gluconobacter oxydans*

En el estudio experimental realizado se ha usado la bacteria *Gluconobacter oxydans* (DSM 50049), ya que según la bibliografía consultada es la que tiene una alta selectividad (95%) por el 3H2MPA y, con ella, se obtienen unas altas conversiones (95-100%) del 2M13PD, trabajando en un reactor discontinuo y a escala laboratorio. Además, es una bacteria no patógena y se trabaja con ella en condiciones prácticamente ambientales.

Gluconobacter oxydans es una bacteria gram-negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*. La forma de la bacteria es desde elipsoidal hasta de varilla, con un tamaño de 0,5-0,8 por 0,9-4,2 μm , que se encuentran individualmente y/o en pares, y raramente en cadenas. Además, es aerobia obligada, ya que tiene un metabolismo respiratorio con el oxígeno como el aceptor de electrones terminal.

Las cepas de esta bacteria prosperan en sustratos azucarados como: todo tipo de frutas, sidra, cerveza, vino, etc. Estas cepas no son patógenas para el hombre y otros animales, pero son capaces de causar podredumbre bacteriana.

Este organismo, tiene una serie de deshidrogenasas unidas a la membrana que están implicadas en muchas reacciones de oxidación, provocando la oxidación incompleta de azúcares, alcoholes y ácidos. La oxidación incompleta conduce a rendimientos casi cuantitativos de los productos de oxidación, lo que hace que la *Gluconobacter oxydans* sea importante a nivel industrial. Se puede usar industrialmente para producir: L-sorbosa a partir de D-sorbitol, ácido D-glucónico, ácidos 5-ceto- y 2-cetoglucónico a partir de D-glucosa, dihidroxiacetona a partir de glicerol, entre muchos otros.

Como necesidades nutritivas, destaca el uso de glicerol o sorbitol como fuente de carbono, como fuente de nitrógeno se suele usar o bien amoniaco o algunos aminoácidos. Este organismo, también necesita las vitaminas B3, B5 y B10.

En cuanto a las condiciones óptimas de crecimiento, la temperatura suele estar entre 25-30°C y el pH idóneo esta entre 5,5-6, aunque se sabe que es capaz de crecer en el intervalo de pH entre 3,5-8. Cabe destacar, que son altamente sensibles a la

concentración de oxígeno disuelto, un aumento de la aireación estimula su crecimiento y sus actividades oxidativas.

3.2.4. Crecimiento microbiano

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, ellos mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para producir nuevos microorganismos, generalmente por bipartición, donde una célula se divide en dos células isomorfas (mismo tamaño y forma). Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por los propios microorganismos. Por tanto, hay dos aspectos claramente diferenciables que hacen al crecimiento microbiano: uno estequiométrico, por el cual, la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y el otro cinético, que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

3.2.4.1. Estequiometría del crecimiento microbiano

La aplicación de la estequiometría requiere conocer los rendimientos. Estos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido (usualmente la fuente de carbono y energía). Por ejemplo el rendimiento celular se define como:

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} \quad (1)$$

X y S representan la concentración de biomasa y sustrato respectivamente. En la práctica, para el cálculo del $Y_{X/S}$, se emplea la expresión:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (2)$$

Si además de microorganismos se forma algún producto en particular, el rendimiento en producto estará dado por:

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} \quad (3)$$

Por tanto, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ son los rendimientos en biomasa y en producto respectivamente. Son parámetros de importancia fundamental, pues dan una medida de la eficiencia del proceso de producción. De este modo en un proceso destinado a la producción de biomasa, el objetivo será maximizar $Y_{X/S}$ y minimizar $Y_{P/S}$. Si lo que interesa es el producto, se tendrá el caso inverso.

3.2.4.2. Cinética del crecimiento microbiano

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es lógico suponer que la concentración de microorganismos, X , influye en la velocidad con la que aumenta la población, r_x . Así:

$$r_x = -\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (4)$$

En esta ecuación, μ es la velocidad específica de crecimiento, la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Existen diversas expresiones para μ , la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo, es decir, el sustrato limitante.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (5)$$

Donde S es la concentración de sustrato limitante, μ_m es la velocidad de crecimiento específica máxima, y K_s se conoce como constante de saturación. El valor de K_s está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el sustrato.

Cuando $S \gg K_s$, μ toma el valor de μ_m y r_x sólo depende de X .

En general K_s tiene valores muy bajos, del orden de los mg/L, por tanto concentraciones relativamente bajas de S son suficientes para hacer que $\mu = \mu_m$. En promedio, las bacterias poseen valores de μ_m cercanos a $0,9 \text{ h}^{-1}$, las levaduras $0,45 \text{ h}^{-1}$ y, los hongos

filamentosos $0,25 \text{ h}^{-1}$, de todos modos μ_m se debe determinar experimentalmente para cada caso en particular.

La presencia de inhibidores del crecimiento en el medio de cultivo causa disminución del valor de μ . La sustancia inhibidora puede ser algún componente del medio de cultivo o algún producto formado por los microorganismos. El tipo de inhibición, puede ser competitiva o no competitiva. Para el primer caso:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s \cdot a + S} \quad (6)$$

Mientras que para el segundo caso:

$$\mu = \frac{\mu_m}{a} \frac{S}{K_s + S} \quad (7)$$

Donde:

$$a = 1 + \frac{I}{K_I} \quad (8)$$

Siendo I la concentración de inhibidor. El valor de K_I está inversamente relacionado con la afinidad del microorganismo por el inhibidor.

En ocasiones algún componente del medio de cultivo puede ser inhibidor del crecimiento, sobre todo cuando se encuentra en concentraciones relativamente elevadas. Esto es factible que ocurra con la fuente de carbono y energía, es decir el sustrato como en este caso, por ser el componente que se encuentra en mayor proporción en los medios. Suele emplearse la siguiente expresión para considerar éste efecto:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{(K_s + S + S^2/K_I)} \quad (9)$$

En cuanto al consumo del sustrato, si reordenamos la *ecuación 1* y derivamos respecto del tiempo se obtiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

O bien:

$$r_s = \frac{1}{Y_{X/S}} r_x \quad (11)$$

Introduciendo la *ecuación 4* en la *ecuación 11*:

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} X \quad (12)$$

También, puede expresarse la velocidad de consumo de sustrato como:

$$r_s = q_s X \quad (13)$$

Donde q_s es la velocidad específica de consumo de sustrato. Comparando las *ecuaciones 12 y 13*, surge que:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (14)$$

Si $\mu = \mu_m$, se tendrá que $q_s = q_{sm}$, es decir, que ambos parámetros están directamente relacionados.

Por tanto, es evidente que el crecimiento puede ser caracterizado mediante tres parámetros: K_s , μ_m e $Y_{X/S}$. Estos dependen tanto del microorganismo como del medio de cultivo empleado, por lo que su evaluación debe realizarse para cada caso en particular.

Suponiendo que no se forma producto y que la relación μ - S puede ser representada por la *ecuación de Monod* surge que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{XS}{K_s + S} \quad (15)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m}{Y_{X/S}} \cdot \frac{XS}{K_s + S} \quad (16)$$

El sistema formado por las *ecuaciones 15 y 16* posee solución analítica, pero en ésta no aparece X en forma explícita por lo que resulta de escasa utilidad. En cambio es posible analizar casos particulares haciendo algunas suposiciones.

Por ejemplo, se puede asumir que durante una buena parte del tiempo se cumplirá que $S \gg K_s$, por lo tanto las *ecuaciones 15 y 16* se reducen a:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (17)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_m X}{Y_{X/S}} \quad (18)$$

Por tanto bajo las condiciones indicadas el crecimiento se llevará a cabo con el máximo valor de μ posible. Integrando la ecuación 17 con la condición a $t = 0$, $X = X_0$, se llega a la expresión:

$$X = X_0 + e^{\mu_m t} \quad (19)$$

O bien:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m t \quad (20)$$

La ecuación 19 establece que para $S \gg K_s$ el crecimiento es exponencial (fase exponencial (II)), y por la ecuación 20 es posible calcular el valor de μ_m graficando el $\ln X$ en función del tiempo.

La variación de S con t se obtiene introduciendo la ecuación 19 en la ecuación 18 e integrando con la condición:

$$\begin{aligned} a \quad t = 0, \quad S = S_0 \\ S = S_0 - \frac{X_0}{Y_{X/S}} (e^{\mu_m t} - 1) \end{aligned} \quad (21)$$

A medida que el cultivo transcurre, S disminuye hasta que se llega a la condición en que S es comparable a K_s y por lo tanto dX/dt comienza a disminuir (fase de desaceleración (III)) hasta hacerse finalmente nula cuando $S = 0$. En este punto se alcanza la máxima concentración de biomasa y finaliza el *batch* (fase estacionaria (IV)). La concentración final de biomasa, X_f , se puede calcular si se conoce el $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = - \frac{(X_f - X_0)}{(S_f - S_0)} \quad (22)$$

Puesto que $S_f = 0$, resulta:

$$X_f = X_0 + Y_{X/S} S_0 \quad (23)$$

En la Figura 5 se representan las distintas fases de crecimiento descritas, que surgen de suponer válida a la ecuación de Monod. Sin embargo antes de la fase exponencial suele existir otra fase (I) conocida como fase de retardo, durante la cual la concentración de

biomasa no se modifica sustancialmente, pero ocurren profundos cambios en la composición macromolecular y en el estado fisiológico de las células, ambos tendientes a adaptarlas al nuevo entorno.

Si se considera esta fase, debe aplicarse una corrección a la ecuación 20, lo que esencialmente consiste en restarle al tiempo real el tiempo transcurrido hasta que efectivamente comienza el crecimiento.

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m(t - t_r) \quad (24)$$

Donde t_r , tiene en cuenta la duración de la fase de retardo.

Normalmente esta fase no es deseable ya que significa una pérdida de tiempo, por lo que usualmente se trata de minimizarla. Una forma de lograrlo consiste en hacer crecer el inóculo en un medio de cultivo igual al que se va a emplear posteriormente, y además transferirlo cuando las células se encuentran en plena fase exponencial.

Por otra parte después de la fase estacionaria viene la fase de declinación (V) que consiste en una disminución de la concentración de biomasa debida a la lisis celular. Esta fase puede representarse considerando una cinética adicional en el balance de materia.

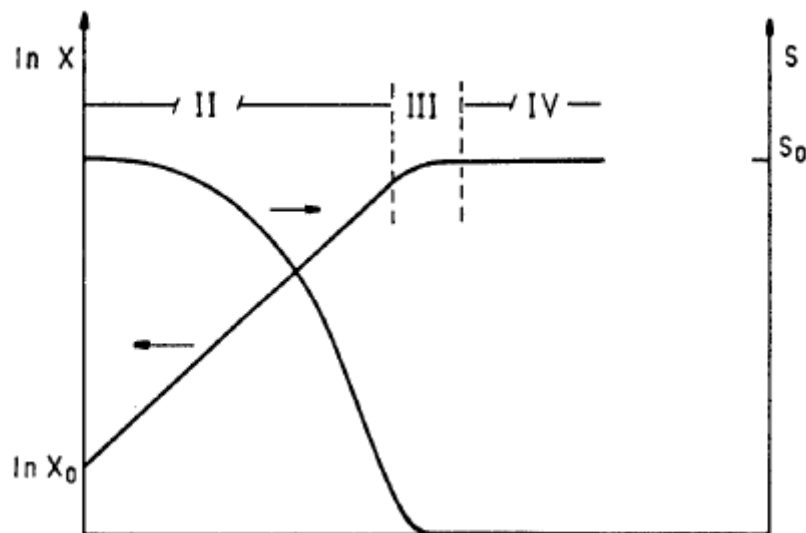


Figura 5. Batch. Curva de crecimiento y consumo de sustrato. II Fase exponencial; III Fase de desaceleración; IV Fase estacionaria

3.3. El Ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico

El ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico o ácido β -hidroxi-isobutírico es una molécula orgánica de cuatro carbonos con dos grupos funcionales: un ácido carboxílico y un alcohol. Este ácido con fórmula molecular $C_4H_8O_3$ tiene una característica que lo hace muy útil para determinados usos, su quiralidad debida a que posee un carbono asimétrico.

Este tipo de compuestos químicos, los ácidos β -hidroxicarboxílicos, son de gran importancia y se han usado para la elaboración de numerosos productos químicos. Así todo, estos compuestos ópticamente activos se han utilizado como precursores para la síntesis de vitaminas, aditivos alimentarios, antibióticos y feromonas.

3.3.1. Obtención del ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico

Hay muchas formas encontradas en la bibliografía para obtener este ácido. Existen tanto métodos químicos como métodos biológicos basados en fermentaciones, estos últimos son muy numerosos, sobretodo en los últimos años. Hay estudios que usan hongos, otros levaduras o bacterias, o microorganismos modificados genéticamente para proporcionar un rendimiento mayor.

En este trabajo experimental, se usa como sustrato un diol, en concreto el 2-metil-1,3-propanodiol, y que teóricamente el estudio de obtención de este ácido se basa en su papel como precursor en la obtención del metacrilato. En determinados artículos se utiliza este último para la producción de un ácido con mucha importancia en la industria farmacéutica.

Otro de los precursores habituales es el ácido isobutírico el cual se metaboliza al ácido β -hidroxi-isobutírico.

3.3.1.1. Métodos químicos

Uno de los métodos más significativos, obtiene el ácido metacrílico, para después ser hidrolizado para obtener el ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico.

Utiliza como materias primas metiletilacetona que se obtiene a partir del 2-butanol, que a la vez se obtiene en el cracking del petróleo, formaldehído, hipoclorito de sodio, ácido clorhídrico y ácido sulfúrico.

Una vez realizada la reacción se extrae mediante dietiléter y este extracto se destila para eliminar el éter, quedando el ácido metacrílico junto con algunas impurezas. Se suele utilizar cobre o algún otro inhibidor para evitar la polimerización del ácido.

Otro proceso para obtener el ácido β -hidroxi-isobutírico por métodos químicos es a partir de formaldehído y α -bromopropionato.

3.3.1.2. Métodos biológicos

En los diferentes artículos que se han consultado se han usado distintos precursores para obtener el ácido, los más habituales son el ácido isobutírico y el ácido metacrílico, pero últimamente también se han publicado diversos artículos en los que se utiliza como precursor el 2-metil-1,3-propanodiol, un producto muy económico disponible en el mercado como subproducto en el proceso de obtención del butanodiol mediante una reacción de hidroformilación de un alcohol alílico y gas de síntesis, reacción sencilla y poco costosa.

El método biológico más interesante y que mejor resultados ha dado es el que se presenta en este proyecto, la obtención mediante bacterias, sobre todo del tipo *Gluconobacter*, que resulta un proceso bastante interesante, innovador y sencillo de obtención del producto.

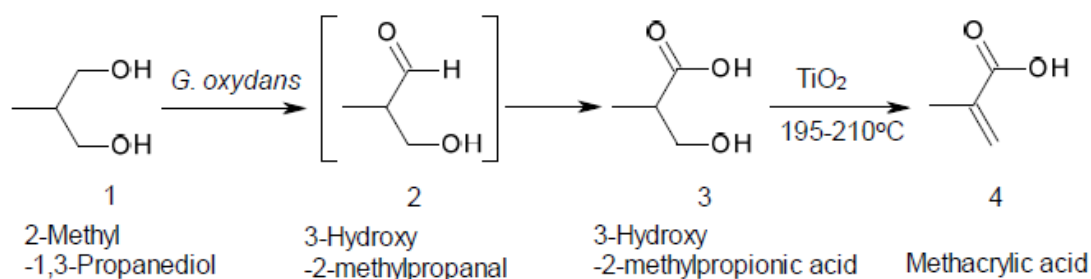


Figura 6. Esquema de la conversión del 2M13PD a ácido metacrílico por fermentación bacteriana y deshidratación catalítica

3.4. Biorreactores o fermentadores

El recipiente en el que se lleva a cabo un proceso de fermentación industrial se denomina biorreactor o fermentador. Es el recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

Un biorreactor debe:

- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación.
- Mantener constante y homogénea la temperatura.
- Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga su consumo.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro, una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado.

Para satisfacer todos estos puntos, es necesario que el biorreactor esté provisto de unos sistemas de agitación, de aireación, de control, de climatización y de esterilización adecuados.

Los dos tipos de biorreactores muy utilizados actualmente son el reactor de tanque agitado y el reactor *air lift*.

En los reactores de tipo *air lift* es el propio aire inyectado al cultivo lo que promueve la agitación. Básicamente consiste en dos cilindros concéntricos y por la base de uno de ellos, por ejemplo el interior, se inyecta aire. De este modo se genera una circulación de líquido ascendente en el compartimento interno y descendente en el externo, lo que favorece el mezclado.

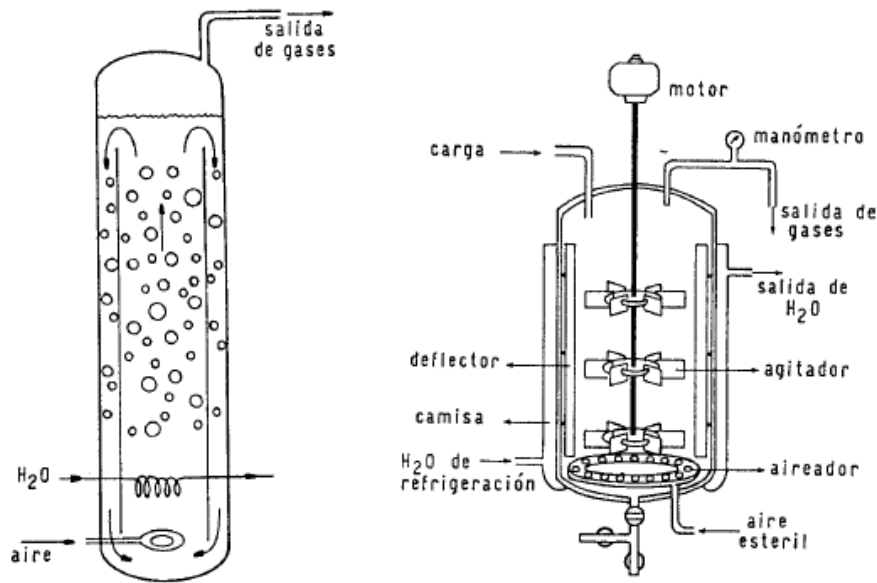


Figura 7. Esquemas de un reactor air lift y un reactor de tanque agitado

En el reactor de tanque agitado, la agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de palas accionado por un motor. Consisten básicamente en un gran cilindro cerrado por la parte superior y la inferior, dotado de diversas tuberías y válvulas.

El oxígeno es poco soluble en agua, y en un fermentador con una elevada densidad de población microbiana, el cultivo requiere una enorme cantidad de oxígeno. Para garantizar una aireación adecuada al cultivo se usan dos mecanismos distintos: un dispositivo de aireación llamado difusor y un dispositivo de agitación llamado agitador. El difusor generalmente consiste en una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente o una tobera a través de los cuales se insufla aire esterilizado por filtración (o aire enriquecido con oxígeno) a alta presión en el fermentador. El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0,45 micrones, que impide el paso de microorganismos y esporas. El aire entra en el fermentador en forma de burbujas diminutas, desde las cuales el oxígeno pasa al medio líquido por difusión. En los fermentadores pequeños se puede garantizar la aireación adecuada usando únicamente un difusor, pero en los fermentadores industriales resulta esencial agitar el contenido del fermentador con un agitador. La agitación realiza dos funciones: mezclar las burbujas de gas a través del medio líquido y mezclar el microorganismo en el medio de cultivo, lo cual garantiza un acceso uniforme de las células microbianas a los nutrientes. El sistema

de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que producen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado.

Debido a que la esterilización del medio de cultivo y la eliminación del calor generado son vitales para que la fermentación tenga un resultado satisfactorio, el fermentador posee una cubierta refrigerante externa o camisa a través de la cual circula vapor (para la esterilización) o agua (para el enfriamiento). En el caso de los fermentadores de gran tamaño, la cubierta no puede transferir suficiente calor, por lo que se deben instalar serpentines internos a través de los cuales puedan circular el vapor o el agua. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también lo es la cantidad de calor generado, por lo que se hace necesario una mayor área de refrigeración.

El tamaño de los fermentadores varía desde los pequeños recipientes a escala de laboratorio, con capacidades de 5 a 10 litros, hasta los enormes recipientes a escala industrial con capacidad para 500.000 litros. Los fermentadores a escala industrial generalmente se fabrican de acero inoxidable y están pulidos a fin de facilitar la limpieza y posterior esterilización.

El esquema general de un proceso de fermentación se puede observar en la *figura 8*. Como puede verse existen cuatro etapas diferenciadas:

1. Propagación de los cultivos, que incluye la formulación del medio de cultivo, la esterilización del medio y el equipo utilizado y la producción de un cultivo activo para inocularlo al biorreactor o fermentador.
2. Fermentación, donde a parte del crecimiento del organismo y la formación del producto, también se engloba la preparación y esterilización de los medios y equipos que se utilizan en esta etapa (previamente a la inoculación).
3. Operaciones de extracción y procesos de separación y purificación de los productos, estas etapas comprenden en forma general y sucesivamente: separación de insolubles por filtración, centrifugación o decantación;

separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción o ultrafiltración; purificación por extracción líquido-líquido, extracción en dos fases o cromatografía, y finalmente, aislamiento del producto.

4. Tratamiento de los efluentes producidos.

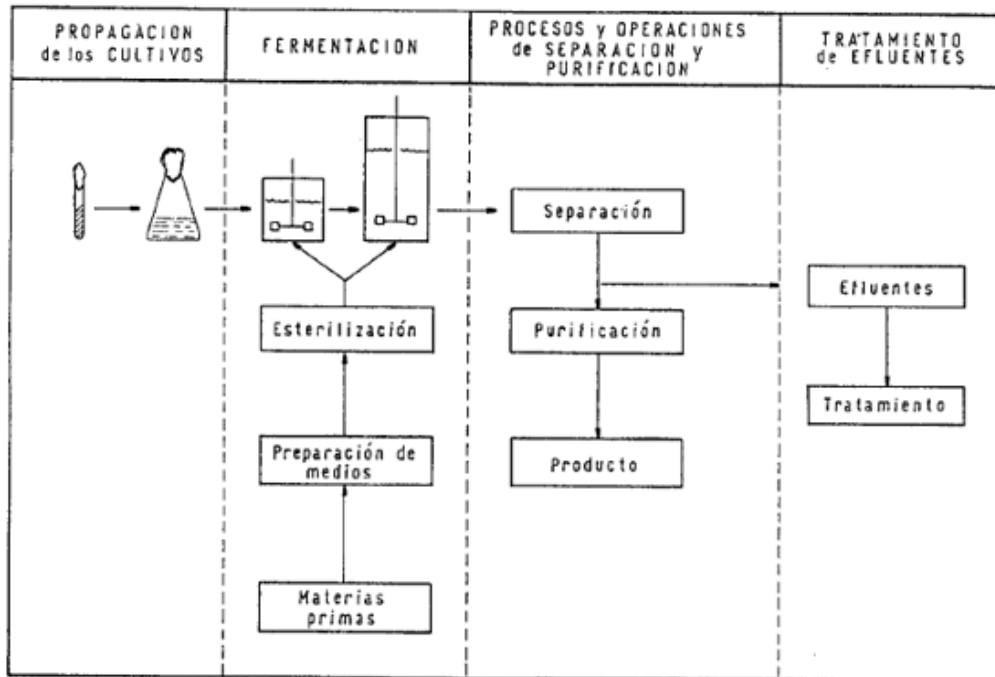


Figura 8. Esquema general de un proceso de fermentación

Es importante tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente ligadas e integradas ya que es indispensable que el proceso sea optimizado globalmente.

3.4.1. Sistemas de cultivo

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el biorreactor:

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Formación} - \text{Consumo}$$

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1C_{i1} - F_2C_i + Vr_{fi} - Vr_{ci} \quad (25)$$

Donde V es el volumen de cultivo, F_1 es el caudal de alimentación, F_2 es el caudal de salida, C_{i1} la concentración del componente "i" en la alimentación y C_i la concentración en el caudal de salida, la que, si el cultivo está bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del biorreactor. Los restantes términos, r_{fi} y r_{ci} se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente "i" respectivamente.

Por otra parte el volumen de cultivo variará en el tiempo según sean F_1 y F_2 . Suponiendo que la densidad del cultivo y de la alimentación son iguales resulta:

$$\frac{dV}{dt} = F_1 - F_2 \quad (26)$$

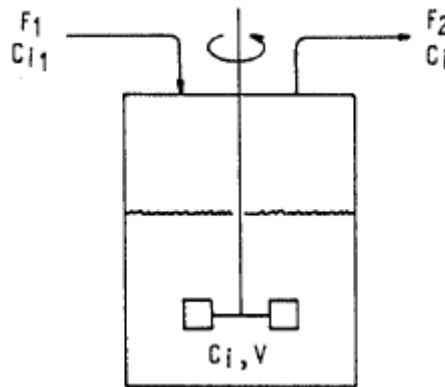


Figura 9. Esquema de un biorreactor con indicación de los caudales y concentraciones de entrada y salida

Ahora bien, dependiendo de cómo sean F_1 y F_2 surgen, básicamente, tres sistemas de cultivo:

I. Cultivo continuo:

Ambos caudales son iguales y por la ecuación 26, V es constante, por lo tanto la ecuación 25 se reduce a:

$$V \cdot \frac{dC_i}{dt} = F(C_{i1} - C_i) + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (27)$$

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo *batch* y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y que mantiene el volumen constante. El caudal de salida contendrá células, medio de cultivo

parcialmente agotado y, eventualmente, algún producto. Si alimentamos con medio fresco significa que $X_1 = 0$ y $P_1 = 0$, por lo que sólo deberemos considerar la concentración de sustrato limitante del crecimiento, S_1 , en la alimentación.

II. Cultivo discontinuo alimentado o *Fedbatch*:

El caudal de salida, F_2 , es nulo, por lo que V aumentará en el tiempo en función del caudal de entrada.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (28)$$

Y en el balance de materia se anula el término F_2C_i , resultando:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = FC_{i1} + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (29)$$

Debe destacarse que en este caso V permanece dentro del operador diferencial pues varia con el tiempo según la *ecuación 28*. Por tal motivo el *fedbatch*, y a diferencia del caso anterior, tiene duración limitada en el tiempo ya que el volumen no puede incrementarse más allá del volumen útil que posee el biorreactor.

Para iniciar un *fedbatch* valen las mismas consideraciones que se hacen para iniciar un cultivo continuo, salvo que en este caso se suele suponer que se inicia la alimentación del cultivo cuando el sustrato limitante se ha agotado. Si bien éste no es un requisito indispensable, permite simplificar los cálculos y además es un buen punto de partida con respecto al objetivo del *fedbatch*, es decir, controlar la velocidad de crecimiento mediante la velocidad de alimentación. También se supone que se alimenta con medio de cultivo fresco, es decir que $X_1 = 0$ y $P_1 = 0$.

III. Cultivo discontinuo o *batch*:

Ambos caudales son nulos por lo que V es constante y en la *ecuación 25* se anulan los términos F_1C_{i1} y F_2C_i .

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} - r_{ci} \quad (30)$$

La duración del cultivo *batch* es, por supuesto, también limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio, la

concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el batch.

Aplicando la *ecuación 30* a la biomasa, al producto y al sustrato resulta:

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu X \quad (31)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_s = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (32)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (33)$$

Las ecuaciones desarrolladas para un cultivo *batch* aparecen en el apartado de cinética microbiana.

3.4.2. Parámetros de control

Es esencial que los fermentadores industriales estén sometidos a un seguimiento exhaustivo durante el proceso de producción. No sólo es necesario medir el crecimiento del cultivo y la formación del producto, sino que también se debe controlar el proceso modificando los parámetros ambientales que sean necesarios. Los factores ambientales que se suelen controlar son la temperatura, la concentración de oxígeno, el pH, la biomasa, los niveles de nutrientes básicos y la concentración del producto, y que dependen del microorganismo utilizado en cada caso.

Los parámetros de control óptimos para el crecimiento de *G. oxydans* son una temperatura entre 25-30°C y un pH idóneo entre 5,5-6, aunque se sabe que es capaz de crecer en el intervalo de pH entre 3,5-8. Estas bacterias son altamente sensibles a la concentración de oxígeno disuelto, y un aumento de la aireación estimula su crecimiento y sus actividades oxidativas.

La temperatura se controla con un termómetro de mano y el pH con papel indicador universal de pH en el laboratorio.

La velocidad de transferencia de O₂ (RO₂), desde el seno de la fase gaseosa (burbujas) hasta la fase líquida viene dada por la siguiente ecuación:

$$R_{O_2} = K_L a (C^* - C) \quad (34)$$

Donde $K_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, C la concentración de O_2 disuelto en el seno del líquido y C^* la concentración de O_2 disuelto, que estaría en equilibrio con la presión parcial de oxígeno de la fase gaseosa. El $K_L a$ depende del diseño del biorreactor, de las condiciones de operación (caudal de aire, agitación) y de la viscosidad del cultivo. A mayor viscosidad menor $K_L a$. Cuando la velocidad de consumo del oxígeno varía con el tiempo, como ocurre por ejemplo en un cultivo *batch* el cálculo de $K_L a$ necesario se realiza empleando el máximo valor de RO_2 esperado, a fin de asegurar un adecuado suministro de O_2 durante todo el cultivo.

3.4.3. Escalado

Es importante entender los problemas que aparecen en el escalado, porque los procesos industriales raramente presentan el mismo comportamiento en fermentadores a gran escala que en equipos de laboratorio a pequeña escala. El escalado de un proceso industrial es la principal tarea de la que se ocupa la ingeniería bioquímica, que está familiarizada con aspectos como la transferencia de gases, la dinámica de fluidos, el mezclado y la termodinámica. El escalado requiere un gran conocimiento no sólo de la biología del microorganismo productor, sino también de la física del diseño y el funcionamiento del fermentador.

Muchos de los retos del escalado están originados por la necesidad de aireación y mezclado. Estos elementos, esenciales en una fermentación industrial, son mucho más fáciles de controlar en un matraz de laboratorio que en un gran fermentador industrial. La transferencia de oxígeno, en particular, es mucho más difícil de conseguir en un gran fermentador, y dado que la mayoría de fermentaciones industriales son procesos aeróbicos, la transferencia efectiva de oxígeno tiene una importancia crucial. Con los medios de cultivo ricos empleados en los procesos industriales, se obtiene una alta densidad celular, lo que conlleva una gran demanda de oxígeno. Si los niveles de oxígeno llegan a ser limitantes, aunque sólo sea durante un período de tiempo corto, el cultivo puede experimentar una anoxia temporal, lo cual provocará la reducción o incluso la interrupción de la síntesis del producto.

La transferencia de un proceso industrial desde el laboratorio hasta un fermentador comercial se realiza en varias etapas. El proceso comienza en el matraz de laboratorio con una operación a pequeña escala que generalmente ofrece los primeros indicios de que un proceso de interés industrial es factible. El proceso se transfiere entonces al fermentador de laboratorio, un recipiente a pequeña escala, generalmente de vidrio y con una capacidad de 1 a 10 litros. Los primeros ensayos de escalado se realizan en este fermentador de laboratorio, donde también es posible ensayar variaciones en el medio, la temperatura, el pH, etcétera, de una manera rápida y sin grandes costes. Cuando los ensayos en el fermentador de laboratorio tienen un resultado satisfactorio, el proceso pasa a la planta piloto, donde se realiza en fermentadores con capacidades de 300 a 3.000 litros. En este punto, las condiciones se aproximan más a las del fermentador comercial, aunque el coste económico todavía no es un factor determinante. Por último, el proceso pasa al fermentador comercial, que tiene una capacidad de 10.000 a 500.000 litros.

Durante todas las etapas del escalado, la aireación es una variable fundamental que está sometida a un control estricto. A medida que el proceso de escalado avanza desde el matraz hasta el fermentador comercial, además de mantener la temperatura, el pH y los nutrientes a niveles adecuados, la dinámica del oxígeno se mide cuidadosamente para determinar cómo afectan los diferentes incrementos de volumen a la demanda de oxígeno de la fermentación.

3.4.4. Medio de fermentación

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos. Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un rol esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes:

- a) Macronutrientes, agregados en cantidad des de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg.
- b) Micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro.
- c) Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

Los medios pueden clasificarse, considerando la naturaleza química de los componentes, en medios sintéticos o medios químicamente definidos, y medios complejos en cuya composición intervienen sustancias de origen animal o vegetal como peptonas, extracto de levadura, macerado de maíz, harina de soja, etc. que aportan las sustancias fundamentales ya mencionadas, pero que son químicamente indefinidas y de composición variable.

Los medios de cultivo definidos se preparan añadiendo a agua destilada cantidades precisas de compuestos orgánicos o inorgánicos purificados. Por consiguiente, en un medio definido se conoce la composición química exacta. La fuente de carbono es de capital importancia en cualquier medio de cultivo, ya que todas las células necesitan grandes cantidades de carbono para hacer nuevo material celular. En un medio definido simple, normalmente está presente una sola fuente de carbono, cuya naturaleza y concentración depende del organismo cultivado. En muchos casos, la composición exacta de un medio no es importante para el crecimiento de muchos organismos. Los medios complejos pueden ser entonces adecuados o incluso ventajosos. A menudo, los medios complejos emplean hidrolizados de productos animales o vegetales, como caseína (la proteína de la leche), carne, soja, extracto de levaduras u otras sustancias muy nutritivas, pero sin embargo no definidas químicamente. Tales hidrolizados están

disponibles comercialmente en forma de polvo y pueden ser pesados con facilidad y disueltos en agua destilada para producir un medio. No obstante, una importante limitación al usar un medio complejo es que no se puede controlar su composición nutritiva exacta. En situaciones particulares, en especial en microbiología clínica, los medios de cultivo pueden ser selectivos o diferenciales. Un medio selectivo contiene compuestos que inhiben selectivamente el crecimiento de algunos microorganismos pero no el de otros. En cambio, un medio diferencial es aquel al que se añade un indicador, normalmente un colorante, para permitir la diferenciación de reacciones químicas particulares que ocurren durante el crecimiento. Los medios diferenciales son muy útiles para distinguir especies de bacterias, porque unas realizan la reacción particular y otras no.

Los componentes empleados en las industrias de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre el 10 y el 60% del costo total de muchos productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios.

Las materias primas más importantes corresponden a fuentes de carbono y de nitrógeno.

Las fuentes de carbono pueden ser: hidratos de carbono como glucosa o dextrosa, sacarosa, lactosa, almidón, dextrina; alcoholes como el glicerol y manitol; e hidrocarburos como hexadecano, octadecano y otros. Son muy importantes también por su disponibilidad y costo reducido otras materias primas que contienen hidratos de carbono como granos, melazas, celulosas, etc. También se pueden emplear otros subproductos o efluentes de industrias que por su contenido en fuentes de carbono son interesantes para algunos procesos.

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica más comunes son el amoníaco o las sales de amonio. Las orgánicas están representadas por varios productos como: peptonas, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta y el *cornsteep* (agua de maceración de la industria del maíz).

Una forma de mejorar el rendimiento es mediante la optimización del medio de cultivo y de las condiciones de operación, pero esto está limitado por la capacidad de síntesis máxima del producto deseado que tiene el organismo. La otra posibilidad es el mejoramiento genético de la cepa.

Es muy importante la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas.

3.4.5. Esterilización

Esterilización significa la eliminación de toda forma de vida de un medio o material, lo que se lleva a cabo generalmente por medios físicos, por ejemplo, filtración, o por muerte de los organismos por calor, productos químicos u otra vía.

Esta definición excluye por lo tanto cualquier técnica que resulte solamente en un daño a los microorganismos o atenuación de la actividad de cualquier tipo.

La razón fundamental para efectuar la esterilización es para evitar la competición por los nutrientes en medios de cultivo y permitir así que el cultivo de microorganismos específicos que se utilizan en un proceso de fermentación de los rendimientos esperados en biomasa y/o metabolitos específicos.

Los métodos de esterilización pueden ser de 3 tipos: por destrucción total de microorganismos, por muerte o inactivación y por eliminación con medio físicos.

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que se hace en el laboratorio cuando flameamos un asa de platino o las bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers. Otra manera de destruir contaminantes es con el uso de poderosos agentes oxidantes. Por supuesto ésta metodología, aunque es efectiva, está muy restringida en su empleo. La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos. El

calor húmedo, generalmente en forma de vapor bajo presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización en el laboratorio, que se efectúa en autoclave, o en la industria cuando se esterilizan los medios de cultivo y los equipos de fermentación. En el caso de los autoclaves, se pueden alcanzar presiones de 1 a 3 atmósferas. En escala grande el equipo de producción es esterilizado con vapor saturado bajo presión, y la presión requerida debe ser alcanzada en todas las partes del equipo y el aire debe ser purgado totalmente del sistema (como ocurre también en el caso de los autoclaves) porque la transferencia de calor disminuye mucho en ese caso. Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos.

La eliminación física, es fundamentalmente llevada a cabo por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

- Los filtros absolutos son de materiales cerámicos, de vidrio o de metal sinterizado con poros tan pequeños que la penetración de los microorganismos no es posible.
- Los filtros fibrosos no son absolutos y el material filtrante puede ser lana de vidrio, amianto y esteres de celulosa, siendo las fibras de un diámetro variable de 0.5 a 15 micrones.

La cinética de esterilización por calor húmedo está caracterizada bastante aproximadamente por una reacción cinética de primer orden.

Si N_0 es el número de organismos viables presentes inicialmente y N es el número de microorganismos viables al final, tendremos que la ecuación de muerte será:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (35)$$

E integrando entre los límites N_0 a $t=0$ y N al tiempo $t=t$, se obtiene:

$$\ln \frac{N_0}{N} = kt \quad \text{ó} \quad \ln \frac{N}{N_0} = -kt \quad (36)$$

N/N_0 es la fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor durante el tiempo t y k es la constante de velocidad de destrucción, que depende de la temperatura según la clásica ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad \text{ó} \quad \ln k = \ln A - \frac{E}{RT} \quad (37)$$

Donde A es el factor preexponencial, E es la energía de activación, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura en grados Kelvin.

Si se grafica el $\ln k$ en función de $1/T$ se obtendrá una línea recta, siendo la inclinación igual a $-E/R$ y la intersección de la recta con la ordenada, el valor de la constante de Arrhenius.

La *figura 10* muestra una curva típica de la esterilización en *batch* de un medio en un fermentador. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporas es 100 °C. Por lo tanto tendremos eliminación de esporas de 100 a 120 °C durante la etapa de calentamiento y de 120 a 100 °C durante la etapa correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo.

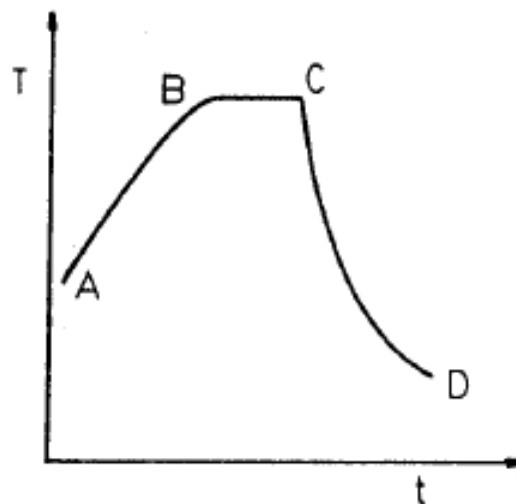


Figura 10. Variación de la temperatura en función del tiempo en un proceso de esterilización en batch

En la práctica de la esterilización es necesario tener presente que la calidad nutricional del medio debe ser preservada todo lo posible, razón por la cual, es imprescindible

diseñar un ciclo de esterilización lo más efectivo posible pero al mismo tiempo lo más corto posible.

Podremos definir un término naba (∇) que representa la magnitud de la disminución del número de organismos viables de manera que:

$$\nabla = \ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = kt \quad (38)$$

Y por tanto:

$$\nabla = A \cdot t \cdot e^{-\frac{E}{RT}} \quad (39)$$

Sin embargo, parte de la destrucción ocurre en la etapa de calentamiento y otra parte en la de enfriamiento, de manera tal que:

$$\nabla_{total} = \nabla_{calentamiento} + \nabla_{mantenimiento} + \nabla_{enfriamiento} \quad (40)$$

Las partes de $\nabla_{calentamiento}$ y $\nabla_{enfriamiento}$ son obtenidas a temperatura variable de manera tal, que es necesario integrar la *ecuación 36* para el período de calentamiento y de enfriamiento con el fin de calcular la cantidad de esporas que se eliminan durante ambos períodos. Conociendo el valor inicial de esporas presentes en el volumen de medio considerado es posible calcular el tiempo de mantenimiento a 120°C para la esterilización completa del mismo.

Lo que es importante en este caso es el tipo de recipiente, su geometría y el volumen de medio a esterilizar. Existen datos en bibliografía de tiempos de esterilización (tiempo de mantenimiento a 120°C), por ejemplo para tubos de ensayo es de 15-20 minutos y para erlenmeyers de 30-35 minutos, estos tiempos aseguran la eliminación de esporas bacterianas de las especies más resistentes.

4. METODOLOGÍA Y MATERIALES

En esta parte de la memoria se presentará todo el trabajo experimental realizado en el laboratorio durante la realización de este proyecto para lograr la producción, separación y caracterización del ácido 2-metil-3-hidroxi-propanoico utilizando la bacteria *Gluconobacter oxydans*.

Incluye la descripción del microorganismo, los diferentes procesos fermentativos que se realizaron a lo largo del proyecto, así como las condiciones empleadas y medios de cultivo y fermentación, que condujeron, finalmente, a la obtención del producto deseado. Finalmente, se muestran los métodos utilizados para la caracterización del producto.

4.1. Descripción general del proceso experimental

Como ya se ha mencionado anteriormente, el proceso de obtención del ácido 2-metil-3-hidroxi-propanoico es un proceso que implica una serie de etapas que comienzan con el crecimiento de la cepa de la bacteria *Gluconobacter oxydans* y finaliza con la caracterización del producto obtenido.

A continuación, se muestra un diagrama que indica las principales etapas realizadas en el proyecto experimental.



Figura 11. Principales etapas realizadas en el proyecto experimental

El primer paso para la obtención experimental del ácido 2-metil-3-hidroxiopropanoico es el crecimiento de la bacteria (*Gluconobacter oxydans*), que se recibe en un tubo en medio sólido y debe crecerse en un medio de cultivo adecuado con los nutrientes esenciales y las condiciones óptimas para la cepa que indica el fabricante, en este caso por litro: 100 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 20 g de carbonato de calcio, a una temperatura de unos 25°C y un pH cercano a 6, se dejan crecer al menos 2 días. Durante el proceso experimental se ha mantenido la bacteria y se ha conservado para su uso en los diferentes experimentos, tanto en frío como en temperaturas de congelación siempre añadiéndole un poco de glicerol para evitar la congelación completa de la bacteria, y la preparación de los diferentes inóculos para las fermentaciones. Una etapa muy importante de todo el proceso es la esterilización de todo el material utilizado, mediante esterilización en seco en estufa a 150°C. Para evitar posibles contaminaciones de los medios de cultivo y fermentación, se ha realizado el filtrado a vacío mediante un kitasato y un papel filtrante de un diámetro suficientemente pequeño para no dejar pasar ningún contaminante que afecte a la fermentación.

Como se ha mencionado anteriormente, la fermentación para este proceso se puede realizar usando diferentes medios de operación. En este caso, se ha decidido realizar la fermentación en discontinuo, aunque en el (0) se realiza en continuo, por los equipos disponibles y horarios en el laboratorio. La fermentación teóricamente dura unas 8 horas, aunque se ha dejado, en algunos casos, un poco más de tiempo.

Tras la fermentación, y ya que se trata de un producto extracelular, se realiza una centrifugación con ayuda de una centrifugadora, a 8000 rpm durante unos 10-15 minutos para separar la biomasa celular del medio de fermentación, donde se encuentra el producto deseado, junto con otros, y parte del medio de fermentación que no ha reaccionado. Para separar el producto se han utilizado varios métodos, se ha probado con una extracción líquido-líquido usando como disolvente acetato de etilo y quitando el exceso de agua que pudiera quedar con sulfato de sodio anhidro antes de la caracterización del producto. También se ha utilizado la evaporación a altas temperaturas, sobre unos 110-140°C, como método para separar el producto del medio de fermentación.

Por último, la última etapa del proyecto es la identificación y caracterización del producto final mediante diferentes técnicas. En un primer lugar, se intenta una cromatografía en capa fina de acetona-agua-cloroformo-etanol-hidróxido de amonio (60:2:6:10:22) y usando como indicador el verde de bromocresol con etanol, para poder identificar en un primer momento si el medio de fermentación muestra presencia del ácido. Como últimas comprobaciones de presencia del ácido, identificación y cuantificación, se ha utilizado la espectroscopia infrarroja (FTIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN).

4.2. Caracterización del microorganismo

La caracterización de la bacteria utilizada se ha realizado mediante la medida de su crecimiento. El crecimiento de una población se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas, como proteínas, ácidos nucleicos o el peso seco de las células. En este proyecto se ha utilizado un método

frecuente de medir el crecimiento, la determinación de la turbidez como medida de la biomasa.

4.2.1. Medida del crecimiento microbiano

Durante el crecimiento exponencial todos los componentes celulares aumentan en proporción al número de células. Un método muy rápido y útil de obtener estimaciones del número de células son las medidas de turbidez.

Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células estén presentes mayor será la luz dispersada y por tanto mayor la turbidez. Lo que realmente se determina por valoraciones turbidimétricas es la masa celular total. Sin embargo, como la biomasa es proporcional al número de células, en un cultivo en crecimiento podemos usar la turbidez para medir el número de células.

4.2.1.1. Densidad óptica

La turbidez puede medirse con un espectrofotómetro, un instrumento que hace pasar la luz a través de suspensiones celulares y detecta la cantidad de luz emergente no dispersada. El espectrofotómetro emplea un prisma o red de difracción para generar luz incidente de longitud de onda específica (*Figura X*). Las longitudes de onda más comúnmente usadas para medir la turbidez bacteriana son 480 nm (azul), 540 nm (verde), 600 nm (naranja) y 660 nm (rojo). La sensibilidad es mayor a longitudes de onda cortas, pero las medidas con suspensiones celulares densas son más exactas a mayores longitudes de onda. Sin embargo, a cualquier longitud de onda lo que se mide es el descenso de luz no dispersada causado por la turbidez. En un espectrofotómetro las lecturas se expresan en unidades de densidad óptica (OD) a una longitud de onda determinada, por ejemplo OD480 indica la medida de la densidad óptica a 480 nm.

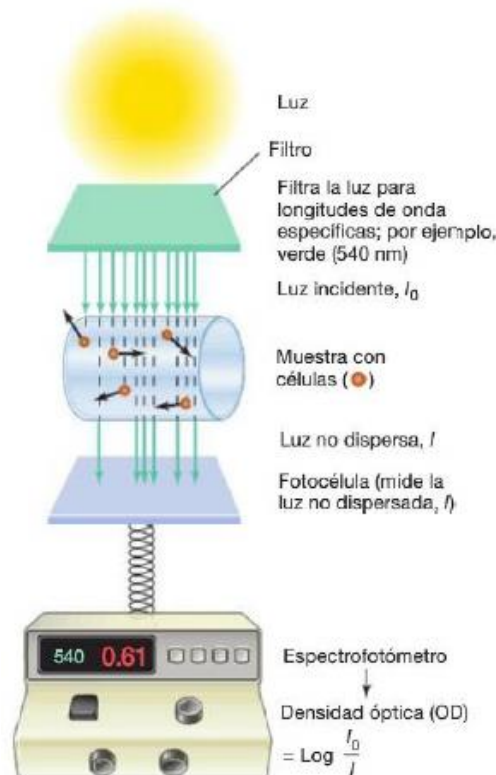


Figura 12. Esquema de un espectrofotómetro

4.2.1.2. Relación entre densidad óptica y número de células

En el caso de organismos unicelulares, la densidad óptica es proporcional (dentro de ciertos límites) al número de células. Por consiguiente, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de conteo directo para células totales o viables. A altas concentraciones celulares, la luz dispersada por una célula, que normalmente no alcanzaría el detector, puede ser redispersada por otra de tal modo que para la fotocélula es como si no hubiese sido dispersada nunca. Cuando esto ocurre, la correspondencia entre el número de células y la turbidez pierde linealidad y las medidas realizadas de densidad óptica son por tanto menos exactas. Sin embargo, dentro de este límite, que varía para cada organismo, las medidas de turbidez pueden ser estimaciones razonablemente precisas del número de células o del peso seco.

Las medidas de turbidez tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar. Además, estas determinaciones se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar notablemente la muestra. Por estos motivos, las medidas de turbidez se usan con frecuencia para seguir el crecimiento de cultivos microbianos. La misma muestra puede

medirse repetidamente y los resultados se pueden representar semilogárfmicamente frente al tiempo.

Por ello, para conocer el crecimiento aproximado experimentalmente de la bacteria utilizada durante el proyecto, se preparan dos medios de cultivo de 250 mL tal y como se menciona en el apartado correspondiente y se dejan varios días en un agitador magnético a 1000 rpm. Los resultados obtenidos de la turbidez medida con espectrofotómetro (480 nm) a lo largo de eso días se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la turbidez medida con espectrofotómetro (480 nm)

| t (h) | OD | OD | LN(OD ₄₈₀) | LN(OD ₄₈₀) |
|-------|------|------|------------------------|------------------------|
| 0,0 | 0,04 | 0,06 | -3,219 | -2,813 |
| 14,2 | 0,30 | 0,13 | -1,204 | -2,040 |
| 35,3 | 0,40 | 0,42 | -0,916 | -0,868 |
| 50,3 | 0,49 | 0,69 | -0,713 | -0,371 |
| 59,3 | 0,57 | 0,71 | -0,562 | -0,342 |
| 76,3 | 0,52 | 0,61 | -0,654 | -0,494 |
| 98,3 | 0,80 | 0,75 | -0,223 | -0,288 |
| 107,3 | 0,76 | 0,86 | -0,274 | -0,151 |
| 124,4 | 0,67 | 0,92 | -0,400 | -0,083 |
| 131,6 | 0,64 | 0,94 | -0,446 | -0,062 |

Si se representan los datos obtenidos de la turbidez semilogárfmicamente frente al tiempo se obtiene la siguiente gráfica en la que se puede observar el crecimiento de la bacteria *Gluconobacter oxydans* a lo largo del tiempo. Se puede apreciar que los datos después de cinco días de uno de los medios de cultivo, el rojo, siguen aumentando, mientras que los del segundo medio de cultivo, el azul, ya empiezan a disminuir, por lo que esta última puede que ya haya empezado a llegar a la fase de declinación mientras que la primera aún se mantiene en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.

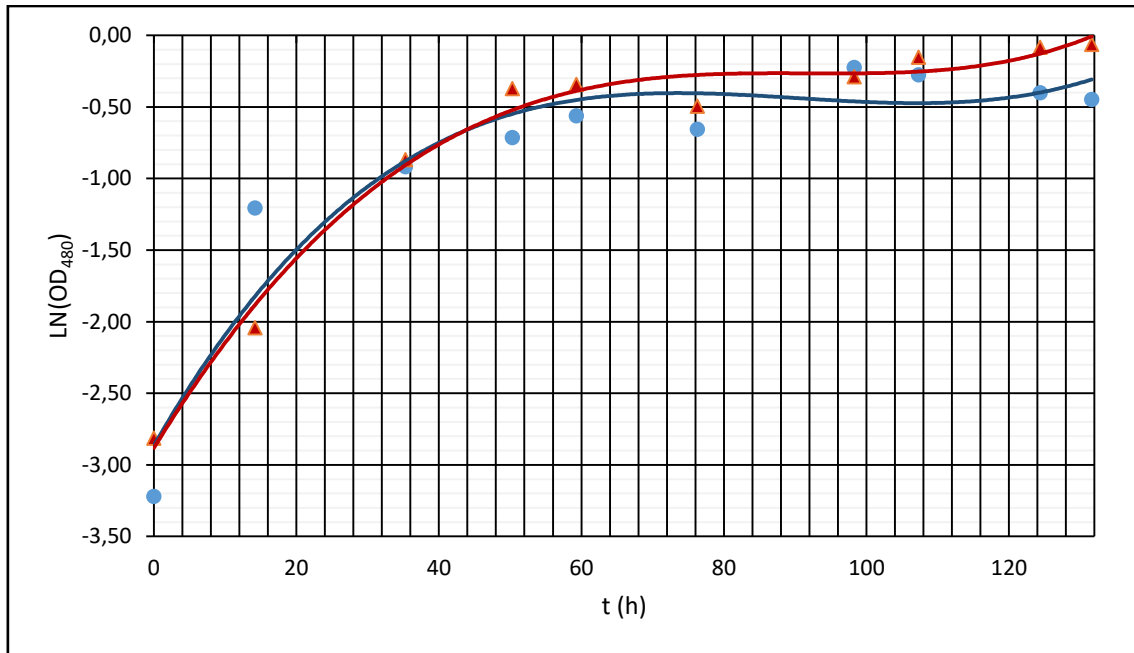


Figura 13. Datos obtenidos de la turbidez semilogarítmicamente frente al tiempo

4.3. Medios de cultivo y fermentación

4.3.1. Medio de cultivo

Las bacterias se encontraban mantenidas en un medio sólido que contenía por litro: 50 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 20 g de CaCO₃, y 15 g de agar-agar a un pH de 6,8.

El medio sólido se hizo crecer en un medio de cultivo adecuado con los nutrientes esenciales y las condiciones óptimas para la cepa que indica el fabricante, en este caso por litro: 100 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 20 g de carbonato de calcio, a una temperatura de unos 25°C y un pH cercano a 6, durante 2 días.

4.3.2. Medio de fermentación

Como medio de fermentación se decidió utilizar un medio químicamente definido, que facilitaba la separación del producto y daba buenos resultados, cuya composición por litro es: 2,6 g de sulfato de amonio, 2,7 g de hidrogenofosfato de sodio y 7,5 g del 2-

metil-1,3-propanodiol. La fermentación se completa teóricamente a las 8 horas, a un pH ácido entre 4 y 5 y a una temperatura ambiente de entre 25-28°C.

4.4. Descripción de los procesos fermentativos

Para la realización de las diferentes fermentaciones a lo largo de todo el proyecto experimental, se plantearon varias combinaciones de bacterias, medios de cultivo, sustratos y condiciones de operación.

Se han utilizado dos bacterias pertenecientes al género *Gluconobacter*, que como ya se ha mencionado son bastante resistentes en medios ácidos y provocan la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares, que es lo que nos interesa para la obtención del producto final, las dos cepas utilizadas son: *Gluconobacter xylinus* y *Gluconobacter oxydans*. Con la primera bacteria, no se consiguió la obtención del producto de interés para este proyecto, ni la oxidación del resto de alcoholes que se probaron con ella; con la segunda bacteria sí que se obtuvieron resultados que son los que se presentan en este proyecto.

En lo que se refiere a medios de cultivo, se han utilizado principalmente medios complejos, ya que son los que aconsejan los laboratorios que nos han suministrado las bacterias, se han utilizado dos formulaciones distintas, en la primera la fuente de carbono es el manitol, cuya composición por litro es: 5 g de extracto de levadura, 3 g de peptona y 25 g de manitol, y una segunda, donde la fuente de carbono sería la glucosa, cuya composición por litro es: 100 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 20 g de carbonato de calcio. Esta segunda formulación, es la que mejor resultados ha dado en la práctica, en cuanto a crecimiento de las bacterias.

Para los medios de fermentación al igual que con los anteriores, se han utilizado diferentes formulaciones tanto químicamente definidas como complejas, pero las complejas no daban tan buenos resultados y resultaba más difícil de separar el producto deseado al final de la fermentación, al no conocer muy bien todos los productos finales que se encontraban en el medio de fermentación. Por lo tanto, se decidió utilizar un medio químicamente definido, que facilitaba la separación del producto y daba buenos

resultados, cuya composición por litro es: 2,6 g de sulfato de amonio, 2,7 g de hidrogenofosfato de sodio y 7,5 g del diol utilizado. Los alcoholes con los que se ha probado como sustratos en estas fermentaciones, para ver con cual se obtenían mejores resultados son: el glicerol, el 1,4-butanodiol y el 2-metil-1,3-propanodiol.

Por último, en cuanto a las condiciones de operación se ha variado el pH en las diferentes fermentaciones, siempre intentando que fuera más bien ácido, se ha variado el grado de agitación durante las diversas pruebas para así poder mejorar la transferencia de oxígeno, pero se ha mantenido en el agitador magnético sobre unos 1000 rpm, muy importante en este proceso para la obtención de buenos resultados, y por último, la temperatura, que se ha intentado controlar, pero debido a las altas temperaturas del periodo de verano siempre han sido más bien altas, lo que ha provocado resultados desfavorables, hasta que la temperatura ambiente disminuyó y finalmente se obtuvieron resultados satisfactorios.

4.5. Separación y purificación del producto

4.5.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar componentes de una mezcla. El éxito de este método depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Cuando se agita un compuesto con dos disolventes inmiscibles, el compuesto se distribuye entre los dos disolventes. A una temperatura determinada, la relación de concentraciones del compuesto en cada disolvente es siempre constante, y esta constante es lo que se denomina coeficiente de distribución o de reparto ($K = \text{concentración en disolvente 2} / \text{concentración en disolvente 1}$).

Es frecuente obtener mezclas de reacción en disolución (porque la reacción se haya llevado a cabo en medio acuoso). En estas situaciones, la extracción del producto de reacción deseado a partir de esta mezcla acuosa se puede conseguir añadiendo un disolvente orgánico adecuado, más o menos denso que el agua, que sea inmiscible con el agua y capaz de solubilizar la máxima cantidad de producto a extraer pero no las

impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción. En este caso se utiliza el acetato de etilo para extraer el ácido 2-metil-3-hidroxi-propanoico del medio de fermentación, que mayoritariamente estará compuesto por agua.

Después de agitar la mezcla de las dos fases para aumentar la superficie de contacto entre ellas y permitir un equilibrio más rápido del producto a extraer entre las dos fases, se producirá una transferencia del producto deseado desde la fase acuosa inicial hacia la fase orgánica, en una cantidad tanto mayor cuanto mayor sea su coeficiente de reparto entre el disolvente orgánico de extracción elegido y el agua. Unos minutos después de la agitación, las dos fases se separan de nuevo, espontáneamente por decantación, debido a la diferencia de densidades entre ellas, con lo que la fase orgánica que contiene el producto deseado se podrá separar mediante una simple decantación de la fase acuosa conteniendo impurezas. Nos quedaremos en estos experimentos con la parte de arriba de la decantación, puesto que el acetato de etilo es menos denso que el agua.

Dado que después de esta extracción, la fase acuosa frecuentemente aún contiene cierta cantidad del producto deseado, se suele repetir el proceso de extracción un par de veces más con acetato de etilo puro.

Una vez finalizada la operación de extracción, se recupera el producto extraído a partir de las fases orgánicas reunidas. Para ello, se tiene que secar la fase orgánica resultante con un agente desecante, se ha usado sulfato de sodio anhidro, se filtra la suspensión resultante y finalmente se elimina el disolvente orgánico de la disolución seca conteniendo el producto extraído por evaporación mediante el uso de un rotavapor, que se muestra en la siguiente figura, básicamente, lo que el rotavapor hace es evaporar las sustancias, por medio del principio de destilación, para luego llevarlas a condensación y lograr separar unos componentes de otros. Por lo que finalmente se recupera el acetato de etilo y se consigue separar el ácido 2-metil-3-hidroxi-propanoico para su posterior caracterización.



Figura 14. Rotavapor utilizado en el laboratorio

4.5.2. Evaporación

Evaporación como proceso físico es el paso de un líquido al estado gaseoso, por absorción de energía (calor). La evaporación ocurre en la superficie del líquido y este término no se debe confundir con la ebullición que es el movimiento provocado por las burbujas de vapor que atraviesan la masa de un líquido que se calienta. Pero siempre que hay ebullición la evaporación es efectiva y rápida.

Como operación unitaria permite remover un líquido de una mezcla, con el objetivo de separar componentes o concentrar una solución, suministrando energía. En el proceso de evaporación se comienza con un producto líquido y termina con uno más concentrado. Este producto más concentrado pasa a ser el producto principal del proceso en esta etapa.

Cuando se usa un medio químicamente definido para la fermentación se suele usar la evaporación como un método rápido y sencillo de eliminar todos los componentes de la mezcla no deseados y concentrar el ácido 2-metil-3-hidroxipropanoico para su posterior caricaturización. Para ello, se introduce el medio ya fermentado en una estufa a una temperatura suficientemente alta para la eliminación del resto de los componentes

(100-120°C), pero siempre sin superar la temperatura de ebullición del ácido, unos 162°C, temperatura a la cual se descompone.

4.6. Caracterización del producto

La última etapa del proyecto es la identificación y caracterización del producto final mediante diferentes técnicas que se resumen a continuación.

4.6.1. Cromatografía de capa fina

La cromatografía en capa fina (en inglés *thin layer chromatography* o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada para compuestos orgánicos. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. En general, los disolventes utilizados se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez.

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase

estacionaria. Así, las moléculas de soluto se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores respectivos de las constantes de los diferentes equilibrios químicos que tienen lugar, que están en función de:

- La polaridad del compuesto, determinada por el número y naturaleza de los grupos funcionales presentes. Los solutos más polares quedarán más retenidos puesto que se adsorben más firmemente a los centros activos de la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluirán con mayor facilidad.
- Naturaleza del disolvente. Así, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del disolvente facilita su desplazamiento en la placa.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como R_f , y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Debido a que es prácticamente imposible reproducir exactamente las condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra debe realizarse eluyendo ambas en la misma placa.

Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión de R_f que muestra la figura.

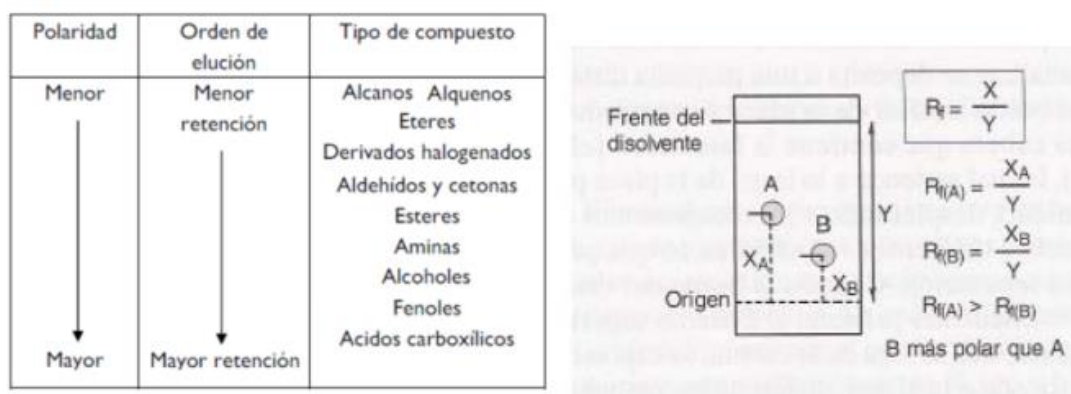


Figura 15. Esquema, ecuaciones y correlaciones de cromatografía en capa fina

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si ésta es excesivamente grande se obtendrá un valor erróneo del R_f .

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto.

En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados.

En la práctica se ha utilizado como disolvente una mezcla de acetona-agua-cloroformo-etanol-hidróxido de amonio (60:2:6:10:22). En la lámina se coloca la muestra a analizar para comprobar si realmente se encuentra el ácido y al lado se pone una muestra de ácido tartárico que nos sirve como guía para comparar si realmente hay ácido, ya que las dos muestras teóricamente se desplazarán prácticamente la misma distancia del punto de partida. Una vez que se sequen las muestras colocadas en la lámina, se deposita en una cubeta previamente cargada con el disolvente y tapada para evitar la evaporación del mismo, y se deja que el solvente ascienda por la lámina. Una vez el solvente haya recorrido la totalidad de la lámina, se retira y se deja secar. Por último, se revela el resultado utilizando como indicador el verde de bromocresol con un poco de etanol que se sulfatan a modo de *spray* sobre la lámina.

4.6.2. FTIR

La espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier o FTIR se usa para la identificación y el estudio de los grupos funcionales de las moléculas que componen el material a analizar.

FTIR está basada en los principios de la espectroscopía molecular. El principio básico detrás de la espectrometría molecular es que las moléculas absorben energía de la luz en longitudes de ondas específicas, conocidas como sus frecuencias de resonancia (vibración). Por ejemplo, las moléculas de agua resuenan (vibran) alrededor del número

de onda de 3450 (se indica como cm^{-1} , el inverso de la longitud de onda), en la región infrarroja del espectro electromagnético.

Un espectrómetro infrarrojo funciona con una pequeña muestra que es colocada en una celda infrarroja, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} . La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra es medida en cada número de onda, lo que permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra sea calculada por la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. Esto se conoce como el espectro infrarrojo de la muestra.

Las mediciones de este proyecto se han realizado con un espectrómetro con el cual se pueden analizar sólidos en polvo, sólidos rígidos, plásticos, materiales elásticos y líquidos. La ventaja de este equipo es que no es necesario preparar la muestra para la medida y que el material a analizar se deposita directamente en la lente. El espectro se obtuvo en un intervalo de número de onda entre 450 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

En la región infrarroja del espectro, las frecuencias de resonancia (vibración) de una molécula se deben a la presencia de grupos funcionales moleculares. Un grupo funcional es simplemente un grupo de dos o más átomos, enlazados de una manera específica. En la molécula de agua (H_2O), el grupo funcional O-H es el que contribuye a la frecuencia de resonancia (vibración) alrededor de los 3450 cm^{-1} .

Una vez que se registra el espectro, sigue la etapa crucial de interpretación del mismo. Por suerte ésta se simplifica, debido a que las bandas se pueden asignar a partes concretas de la molécula que producen lo que se llama frecuencias de grupo: independientemente de a qué esté unido, un grupo funcional absorbe radiación (genera una banda de IR) en un intervalo concreto de frecuencias. Así, las frecuencias de grupo permiten establecer si está presente o ausente en la muestra un grupo funcional dado.

Se ha ido acumulando información sobre la gama de frecuencias a la que pueden esperarse que absorban los distintos grupos funcionales, y se presenta en gráficas de correlación. Se han creado también bases de datos espectrales que facilitan la búsqueda y comparación, en ocasiones incluidas en el software de algunos aparatos.

El IR medio se suele estudiar en cuatro zonas:

- I. Región de vibración de extensión X-H ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$): esta absorción corresponde a la extensión de enlaces con hidrógeno (alcoholes, aminas y enlaces C-H), y no se ve muy afectada por el resto de la molécula por lo que las bandas son bastante constantes en esa zona.
- II. Región del triple enlace ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$): en esta región absorbe un número muy limitado de compuestos, de modo que su presencia se hace fácilmente evidente ($-\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{O}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{N}^+\equiv\text{C}-$).
- III. Región del doble enlace ($2000-1550\text{ cm}^{-1}$): Las bandas principales se deben al grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ ($1830-1650\text{ cm}^{-1}$) y al doble enlace $\text{C}=\text{C}$, siendo la primera mucho más intensa que la segunda y una de las más fáciles de reconocer en el espectro. Otras bandas en esta zona son la $\text{C}=\text{N}$ y la flexión de aminas y alcoholes. En esta región también se muestran cambios en la composición química como la oxidación, representada por un incremento en un pico alrededor de 1740 cm^{-1} .
- IV. Región de huella dactilar ($1500-600\text{ cm}^{-1}$): en esta región del espectro pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de una molécula dan por resultado cambios importantes en la distribución de los picos de absorción. Como consecuencia, la correspondencia de dos espectros en esta región constituye una prueba de su identidad.

Tabla 7. Correlaciones de longitud de onda en un FTIR

| Longitud de Onda | Asignación |
|--------------------------------|--|
| $\approx 2960 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento de grupos metilos (-CH ₃) de n-alcanos. |
| $\approx 2850 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento de grupos metilenos (-CH ₂ -) de n-alcanos. |
| $\approx 1460 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de flexión de grupos metilos (-CH ₃) de n-alcanos. |
| $\approx 1375 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de flexión de grupos metilenos (-CH ₂) de n-alcanos. |
| $\approx 720 \text{ cm}^{-1}$ | Aromáticos monosustituidos o 1,2-disustituidos (≈ 700 a 750 cm^{-1}). Vibraciones de oscilación de grupos metilenos (ρCH_2). Esta banda es típica de n-alcanos de mas de siete átomos de carbono, lo que indica la presencia de n-alcanos de cadena recta. Esta banda puede estar solapada por la banda anterior correspondiente a hidrocarburos aromáticos que es de mayor intensidad. |
| $\approx 3100 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento hidrógeno-carbono (H-C) de olefinas (alquenos). <u>H-C=C.</u> |
| $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento carbono-carbono de olefinas (alquenos). <u>C=C.</u> |
| $\approx 650 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de flexión carbono-hidrógeno de olefinas (alquenos). <u>H-C=C.</u> |
| $\approx 900 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones hidrógeno-carbono en anillos aromáticos. |
| $\approx 1300 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones carbono-carbono (C-C) de anillos aromáticos. |
| $\approx 1410 \text{ cm}^{-1}$ | |
| $\approx 3375 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento -OH de alcoholes y fenoles. |
| $\approx 1260 \text{ cm}^{-1}$ | Esta banda puede ser asignada a los siguientes grupos funcionales: 1.- Vibraciones C-O de alcoholes o fenoles. 2.- Vibraciones de alargamiento C-O-C de éteres. 3.- Vibraciones de alargamiento C-O de ésteres. |
| $\approx 1738 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento C=O. Esta banda puede ser asignada a los siguientes grupos funcionales: ácidos carboxílicos, ésteres, aldehidos o cetonas. |
| $\approx 1076 \text{ cm}^{-1}$ | Vibraciones de alargamiento C-H fuera del plano en hidrocarburos aromáticos. |
| $\approx 1138 \text{ cm}^{-1}$ | |

4.6.3. RMN

La Resonancia Magnética Nuclear o RMN es la herramienta analítica muy importante que proporciona una mayor información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva y tiene amplias aplicaciones.

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopia de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación.

La respuesta a la transición entre estos niveles por la absorción de energía de radiofrecuencia puede ser detectada, amplificada y registrada en lo que sería una línea espectral o señal de resonancia. De esta forma, se generan los espectros de RMN para compuestos con núcleos de momento magnético distinto de cero, entre los que se encuentran el protón (1H), y otros como 13C, 14N, 15N, 19F, 31P, etc. Es importante

saber que para un mismo tipo de núcleo, las frecuencias de resonancia son distintas ya que los entornos químicos son diferentes. De aquí se define el desplazamiento químico.

Además, no todas las líneas espectrales son simples (singletes), sino que como resultado de acoplamientos entre espines nucleares de núcleos vecinos se producen desdoblamientos de señales, separados por una frecuencia característica o constantes de acoplamiento (J).

Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son un imán, actualmente una bobina superconductora, que suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro.

Los espectros más comunes son representaciones de la intensidad de absorción frente a la frecuencia de resonancia (generalmente a través del parámetro δ) y presentan señales cuya posición, forma y tamaño están íntimamente relacionadas con la estructura molecular. El análisis detallado de estos espectros proporciona valiosa información estructural y estereoquímica. Espectros bidimensionales permiten relaciones entre distintos núcleos o distintas magnitudes del mismo núcleo.

Para interpretar un espectro de RMN de protones (es decir, para identificar la molécula a la que corresponde) interesa fijarse en los siguientes parámetros:

- Número de señales, que es indicador del número de grupos de protones magnéticamente diferentes que tiene la molécula.
- Área bajo cada señal, que sirve para contar el número relativo de protones a los que representa.
- Multiplicidad de las señales, que informa en general del número de protones que tienen los grupos vecinos al que da la señal considerada.
- Constantes de acoplamiento, que relacionan unas señales con otras, permitiendo conocer qué grupos están enlazados entre sí.
- Desplazamiento químico, que informa sobre la naturaleza química del grupo que da la señal. Existen tablas y figuras para ello, como la de la figura X.

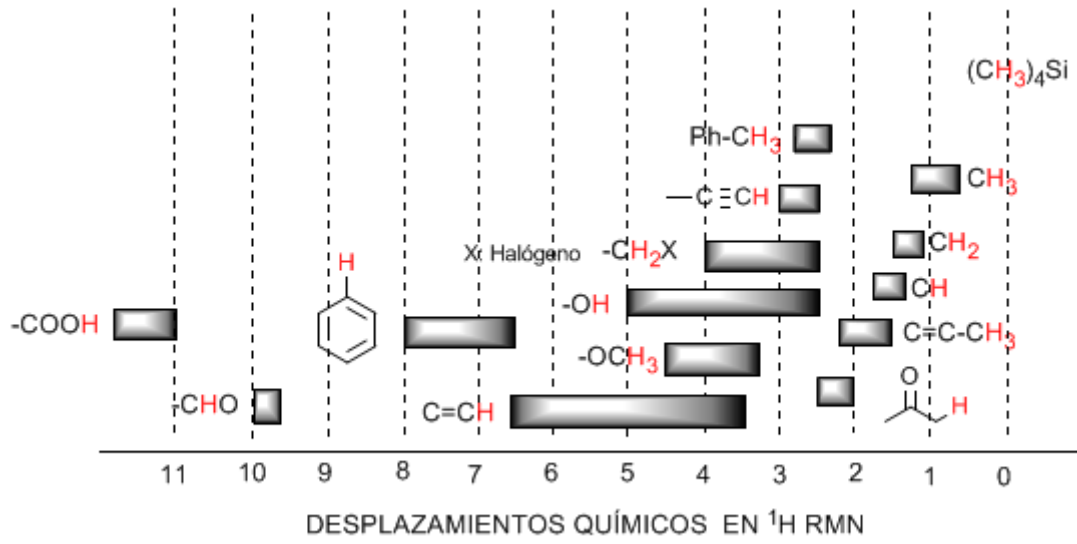


Figura 16. Desplazamiento químico en RMN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron los primeros ensayos de fermentaciones con la bacteria *Gluconobacter xylinus* mientras no se disponía de la bacteria *Gluconobacter oxydans*, que también es productora de ácido acético en condiciones naturales, aunque no es la óptima para este proceso.

Se hicieron crecer las bacterias durante 48 h, a temperatura ambiente en erlenmeyers de 0,250 L, mediante agitación magnética, probando varios medios de cultivo:

Tabla 8. Tipos y composiciones de los medios de cultivo empleados

| Nº | Tipo de medio | Composición del medio |
|----|---------------|---|
| 1 | Complejo | 5 g de extracto levadura 3 g de peptona 25 g de manitol Agua destilada |
| 2 | Complejo | 100 g de glucosa 10 g de extracto de levadura 20 g de carbonato de calcio Agua destilada |
| 3 | Químico | 20 g de glucosa 5,2 g de sulfato de amonio 2,7 g de hidrogenofosfato de sodio Agua destilada |
| 4 | Químico | 40 g de glucosa 5,2 g de sulfato de amonio 2,7 g de hidrogenofosfato de sodio Agua destilada |

Y se concluyó tras estas pruebas, que el mejor medio utilizado para hacer crecer las bacterias es el medio complejo 2, que dio una mayor cantidad de bacterias en 48 h y que fue el utilizado en las siguientes fermentaciones.

Tras el cultivo se aisló la bacteria por centrifugación (8066 rpm, 25 min) y se obtuvieron cantidades apreciables de bacterias (algunos mL) que no se deshidrataron y se usaron directamente para los posteriores ensayos de oxidación.

Las oxidaciones del glicerol y del 2-metil-1,3-propanodiol se realizaron tratando estos productos con las bacterias recogidas, en volúmenes de 0,250 L, las fermentaciones duraron 8 h y se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las composiciones de los

medios de fermentación por litro, el pH inicial y los resultados obtenidos en cada una de ellas se muestran a continuación. Cada uno de estos ensayos se ha probado varias veces.

Tabla 9. Descripción de los ensayos realizados de fermentación

| Ensayo | Medio de fermentación | pH | Bacteria | Resultado |
|---------------|---|-----------------------------|--------------------------|------------------|
| 1 | 2,6 g sulfato de amonio 1,35 g hidrogenofosfato de sodio 5 g de 2M13PD Agua destilada | Neutro 6-7 | Gluconobacter xylinus | Ensayo fallido |
| 2 | 5,2 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 10 g de 2M13PD Agua destilada | Neutro 6-7 | Gluconobacter xylinus | Ensayo fallido |
| 3 | 2,1 g cloruro de amonio 1,35 g hidrogenofosfato de sodio 7,5 g de 2M13PD Agua destilada | Ácido 3-4 (provocado) | Gluconobacter xylinus | Ensayo fallido |
| 4 | 2,6 g sulfato de amonio 1,35 g hidrogenofosfato de sodio 5 g de 2M13PD Agua destilada | Neutro 6-7 | Gluconobacter oxydans | Ensayo fallido |
| 5 | 5,2 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 10 g de 2M13PD Agua destilada | Neutro 6-7 | Gluconobacter oxydans | Ensayo fallido |
| 6 | 2,1 g cloruro de amonio 1,35 g hidrogenofosfato de sodio 7,5 g de 2M13PD Agua destilada | Ácido 3-4 (provocado) | Gluconobacter oxydans | Ensayo fallido |
| 7 | 5,2 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 18 g de 2M13PD Agua destilada | Ácido 3-4 (provocado) | Gluconobacter oxydans | Ensayo fallido |
| 8 | 2,6 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 7,5 g de 1,4-butanodiol Agua destilada | Ácido 3-4 | Gluconobacter oxydans | Ensayo fallido |
| 9 | 2,6 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 7,5 g de Glicerol Agua destilada | Ácido 3-4 | Gluconobacter oxydans | Ensayo exitoso |
| 10 | 2,6 g sulfato de amonio 2,7 g hidrogenofosfato de sodio 7,5 g de 2M13PD Agua destilada | Ácido 3-4 | Gluconobacter oxydans | Ensayo exitoso |

Después del tiempo de reacción establecido, se centrifugaron las bacterias y se reservaron, si fuera conveniente, para otro ensayo.

El medio sobrenadante se trató a alta temperatura (mediante una extracción líquido-líquido) hasta que se evaporó toda el agua. El líquido final se analizó por espectroscopia IR. La presencia de una banda a 1740 cm^{-1} (aproximadamente) indicaría la formación de ácido carboxílico, si no se observa esa banda se considera el experimento fallido, los resultados se muestran en la *tabla 9*.

Tras la realización de los ensayos y de varias fermentaciones en las cuales no se ha obtenido resultados favorables de la aparición del ácido, se analizarán los resultados obtenidos en las dos últimos ensayos realizados (9 y 10), en los que se ha realizado bajo las condiciones establecidas en los apartados anteriores, siete fermentaciones en las cuales se ve bien la evolución y el incremento en la aparición del ácido en las mismas. Estas se han realizado usando como sustrato el 2-metil-1,3-propanodiol y el glicerol. Las condiciones, procedimientos y medios de cultivo empleados, son los mencionados en las secciones anteriores.

En primer lugar, se analizarán los resultados obtenidos por espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier o FTIR.

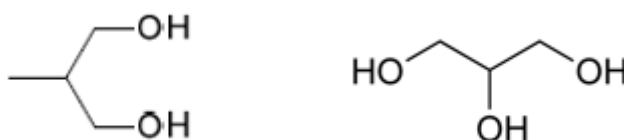


Figura 17. Moléculas de 2M13PD y glicerol.

Para ello, debemos conocer las moléculas de 2M13PD y de glicerol utilizadas en estos experimentos. Estas moléculas son alcoholes por lo que mostrarán bandas en la región correspondiente a la unión -OH y -CH que se encuentra entre $3000 - 2500\text{ cm}^{-1}$, también aparece una banda sobre los 3450 cm^{-1} que es la correspondiente a la molécula del agua, ya sea la que se encuentra presente en el ambiente o porque aún queda un poco de agua en la muestra. El resto de bandas entre $1500 - 450\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la región

de huella dactilar y son característicos de cada molécula por lo que si se produce un cambio en la misma estos picos cambiarán.

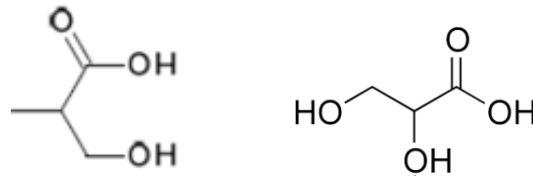


Figura 18. Moléculas de 2M3HPA y ácido glicérico

Lo que se busca es que aparezca la banda perteneciente al doble enlace de los ácidos C=O que se encuentra entre $2000 - 1550 \text{ cm}^{-1}$, más concretamente entre $1830 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. Y la banda que nos indicaría que la oxidación se ha producido que aparece cerca de los 1740 cm^{-1} .

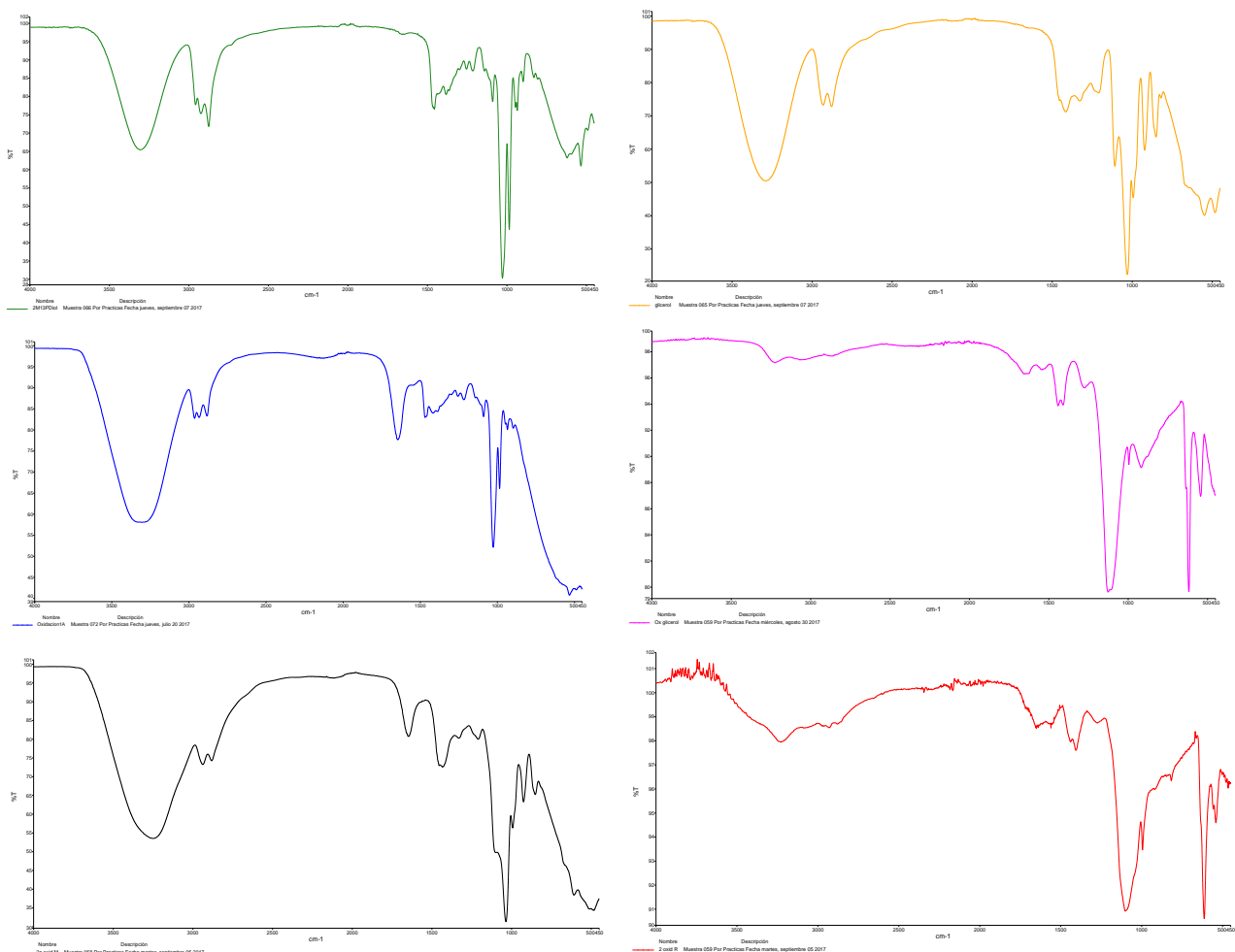


Figura 19. Diagramas obtenidos por FTIR de: 2-metil-1,3-propanodiol (verde), glicerol (amarillo), 1^oFerm. 2M13PD (azul), 1^o Ferm. glicerol (rosa), 2^o Ferm. 2M13PD (negro) y 2^o Ferm. Glicerol (rojo)

En las dos primeras fermentaciones realizadas, casi no se muestran cambios en los diagramas obtenidos por FTIR comparándolas con el sustrato de partida. En los diagramas de las fermentaciones del 2M13PD se muestra un aumento del agua en la muestra y pequeñas variaciones en la región de huella dactilar, pero muy pequeñas, lo que indica que el sustrato sigue estando muy presente en la fermentación. En el caso de las fermentaciones del glicerol hay una disminución de las bandas iniciales pertenecientes a las uniones $-OH$ y $-CH$, pero sigue sin aparecer las bandas que nos indicarían la presencia del ácido y que se haya producido la oxidación.

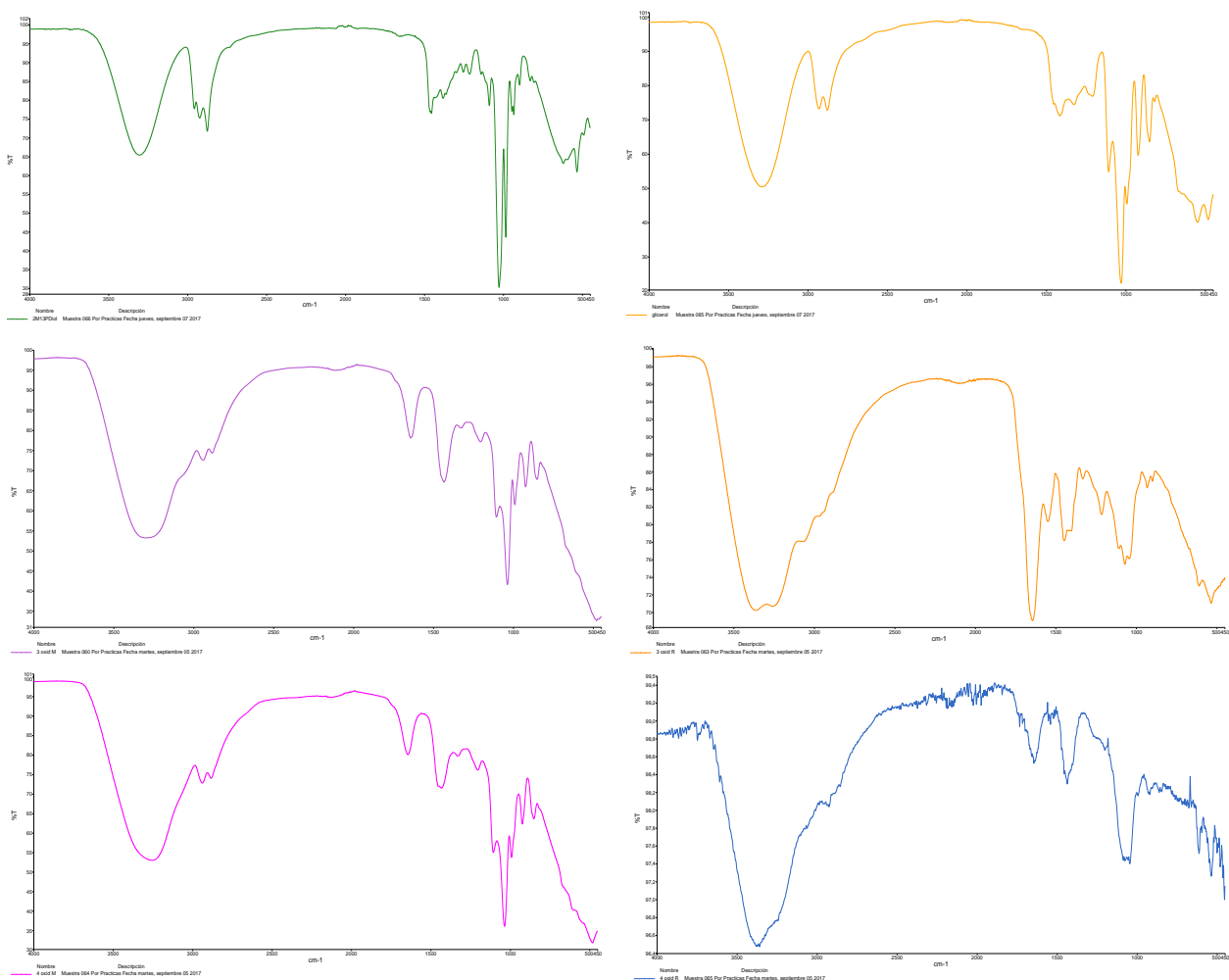


Figura 20. Diagramas obtenidos por FTIR de: 2-metil-1,3-propanodiol (verde), glicerol (amarillo), 3^oFerm. 2M13PD (violeta), 3^oFerm. glicerol (naranja), 4^oFerm. 2M13PD (rosa) y 4^oFerm. Glicerol (azul)

En las sucesivas fermentaciones ocurre lo mismo, se empiezan a observar cambios en las moléculas y empiezan a aparecer suaves bandas en las regiones que esperamos, pero aún son bastante pequeñas para asegurar que realmente existe la presencia de los ácidos.

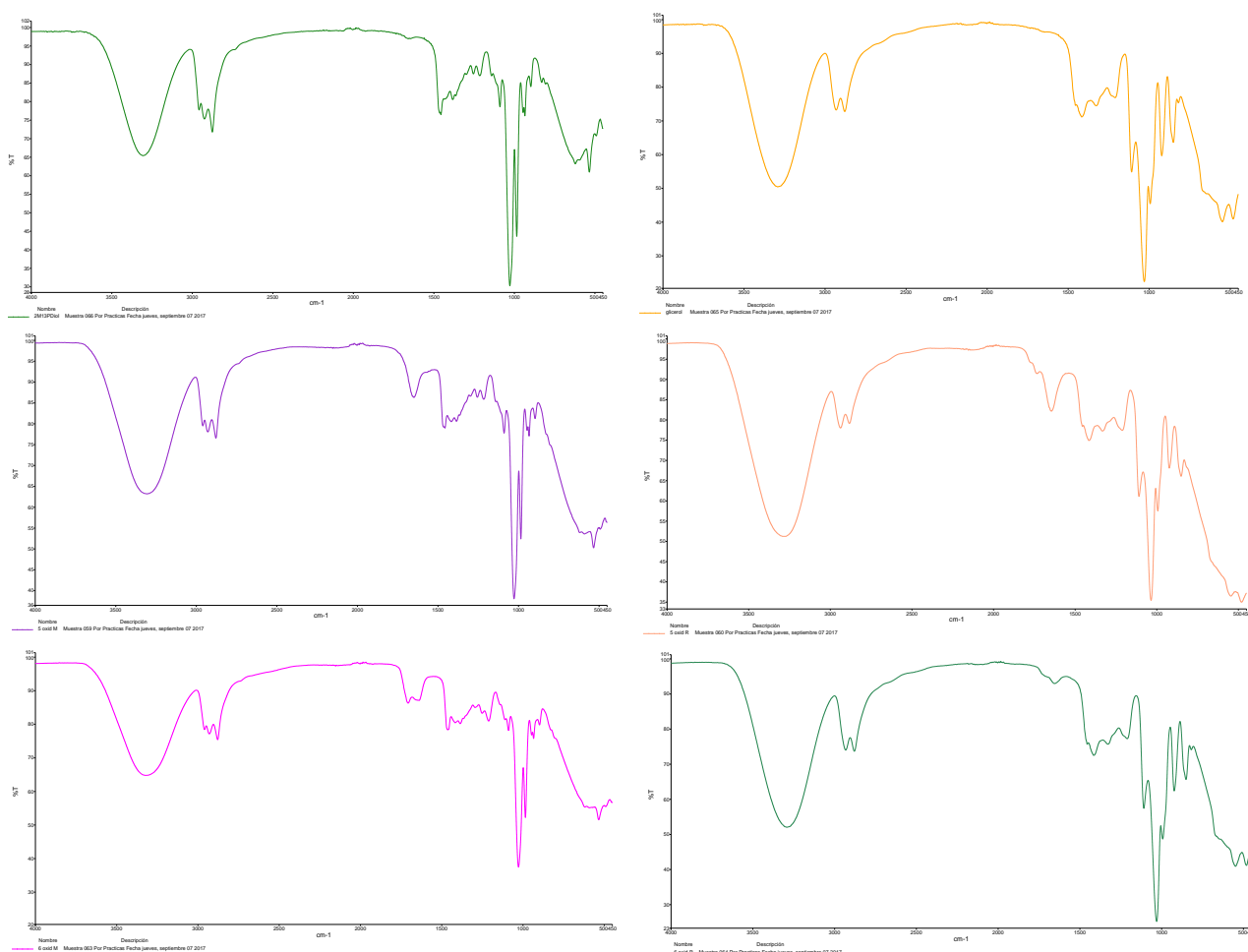


Figura 21. Diagramas obtenidos por FTIR de: 2-metil-1,3-propanodiol (verde), glicerol (amarillo), 5ºFerm. 2M13PD (violeta), 5º Ferm. glicerol (naranja), 6º Ferm. 2M13PD (rosa) y 6º Ferm. Glicerol (verde)

No es hasta la quinta y sexta fermentación cuando se empiezan a ver las bandas sobre los 1740 cm^{-1} que ya nos indican que sí que se ha producido la oxidación y empieza a notarse la presencia de los ácidos. Se muestran en mayor medida en las fermentaciones pertenecientes al 2M13PD, pero mucho menos en las del glicerol.

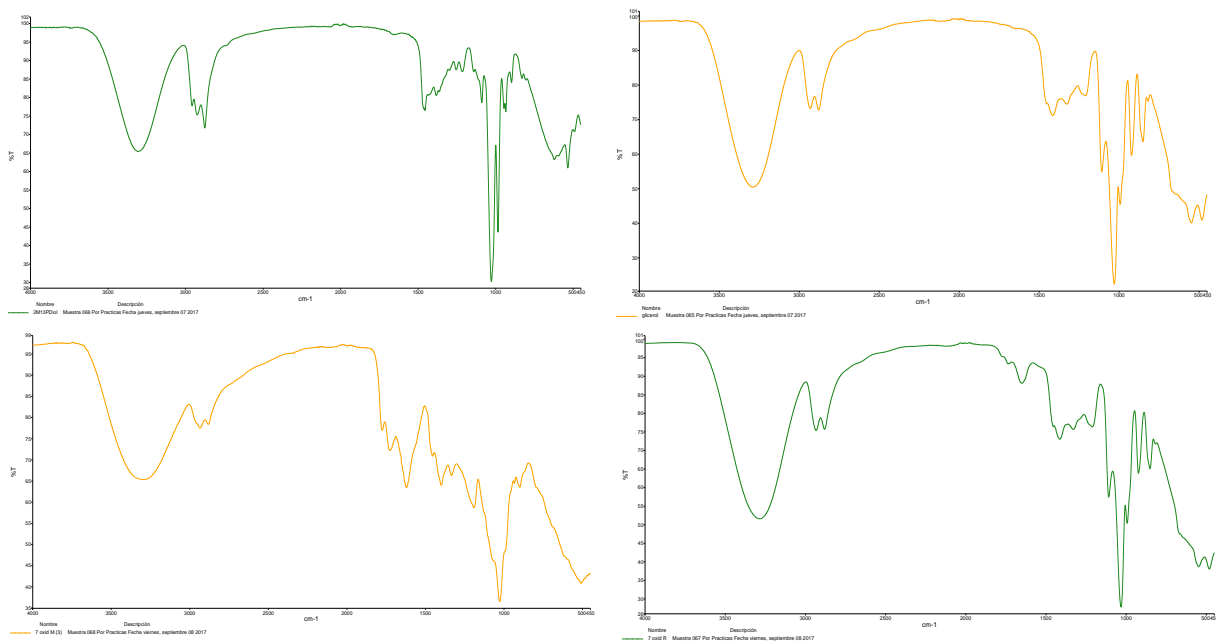


Figura 22. Diagramas obtenidos por FTIR de: 2-metil-1,3-propanodiol (verde), glicerol (amarillo), 7ºFerm. 2M13PD (amarillo abajo), 7º Ferm. glicerol (verde abajo)

Finalmente, en las últimas fermentaciones ya queda confirmada la presencia de los ácidos en ambos casos y las bandas ya se hacen más evidentes. Aunque en las muestras se ve que sigue habiendo gran presencia del sustrato inicial y solo se ha conseguido un 20-30% de rendimiento con el producto deseado, ya sea porque la fermentación todavía no ha terminado o porque las condiciones seguían sin ser las óptimas para la oxidación incompleta de los alcoholes por parte de las bacterias.

Por último, se muestran los diagramas más relevantes enfrentados con los diagramas de los sustratos de partida para obtener una mejor visión de los cambios experimentados en las moléculas, siendo la sexta fermentación una de las mejores para ambos casos, solo superada por la séptima fermentación en el caso del 2M13PD donde la banda se hace mucho superior en la región del ácido.

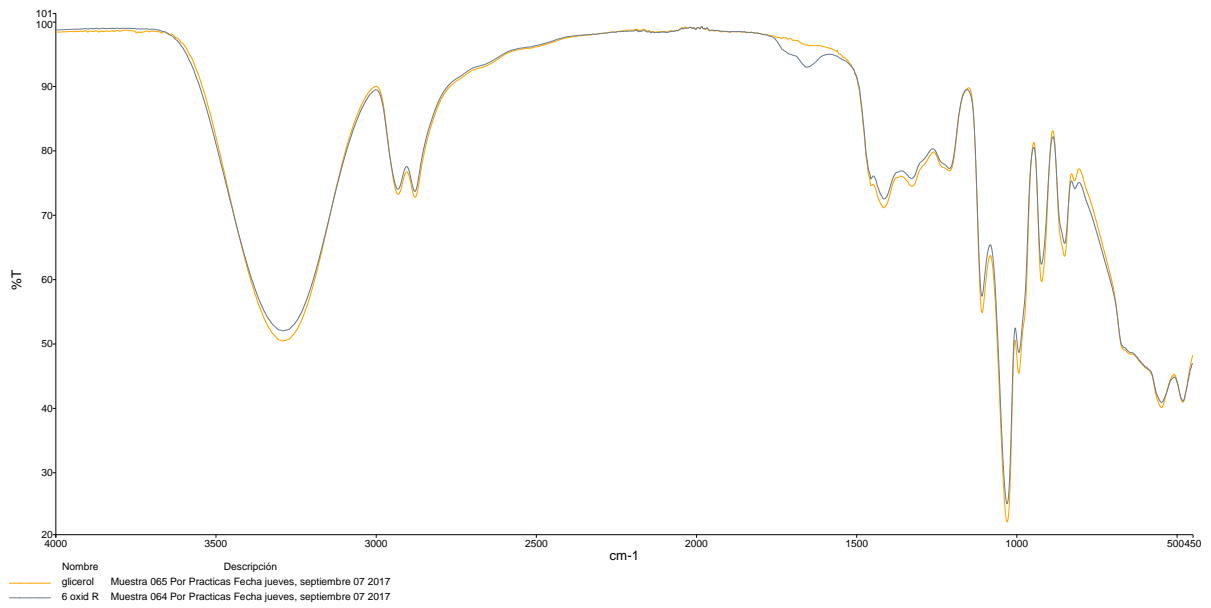


Figura 23. Diagramas obtenidos por FTIR: Glicerol (amarillo) vs 6º Ferm. Glicerol (gris)

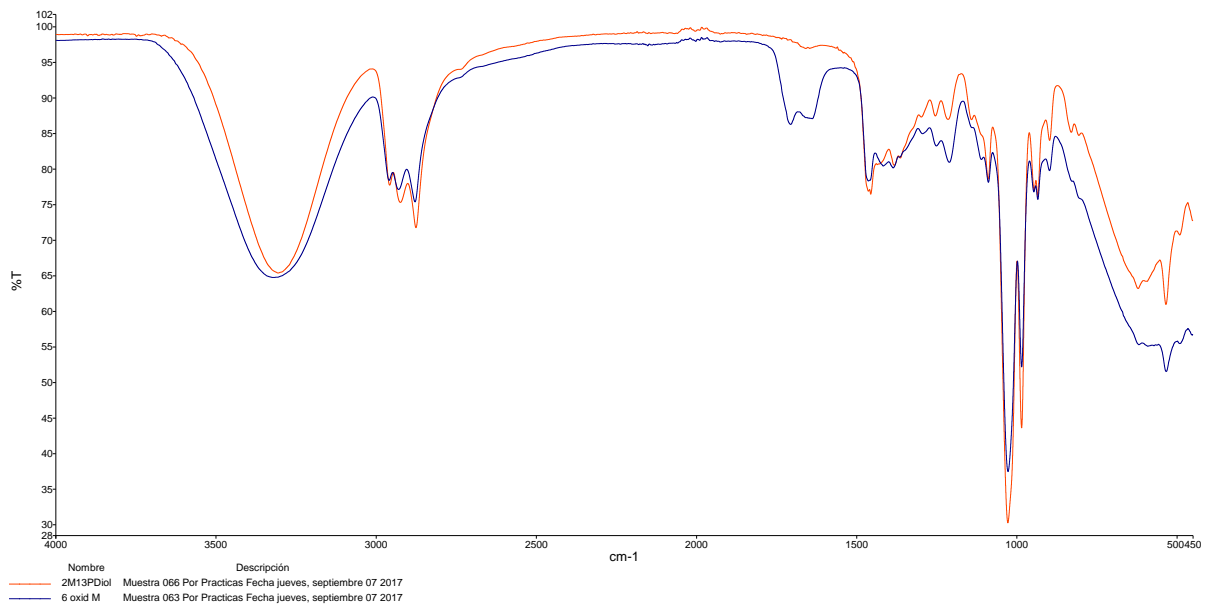


Figura 24. Diagramas obtenidos por FTIR: 2M13PD (naranja) vs 6º Ferm. 2M13PD (azul)

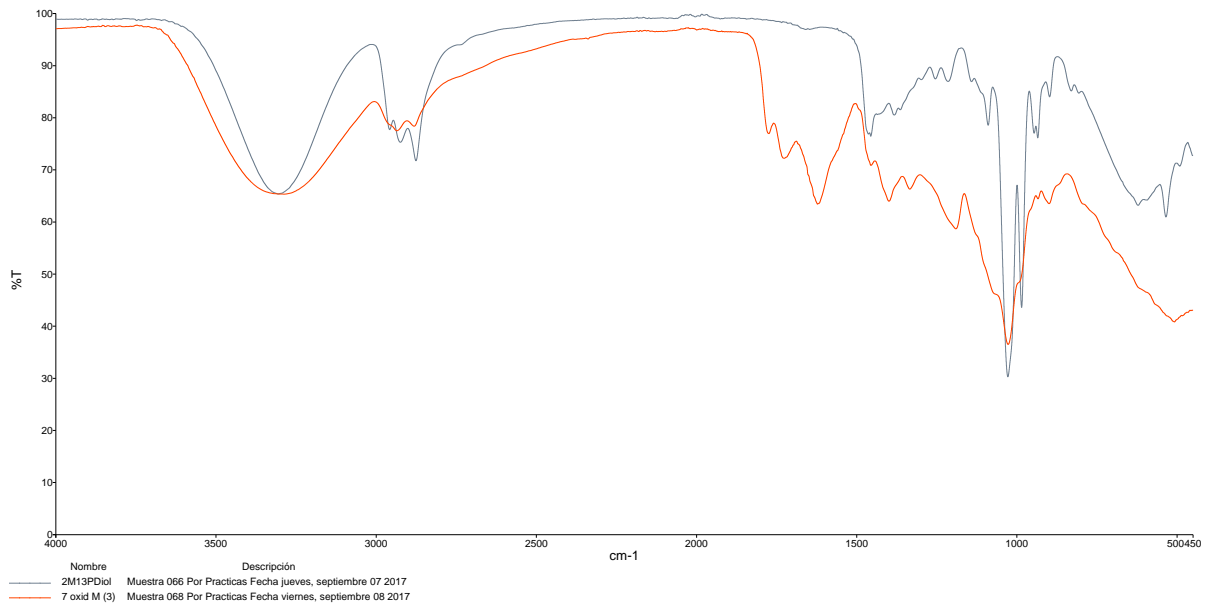


Figura 25. Diagramas obtenidos por FTIR: 2M13PD (gris) vs 7ª Ferm. 2M13PD (naranja)

Al representar el diagrama de la absorbancia del 2M13PD frente a las últimas fermentaciones realizadas se puede ver la clara evolución y el cambio en la molécula, y la mayor transformación en ácido que nos lo indica la banda entre $1830 - 1650 \text{ cm}^{-1}$. La relación entre bandas nos indica que se ha obtenido un rendimiento entre el 20-30% de producto con respecto al sustrato.

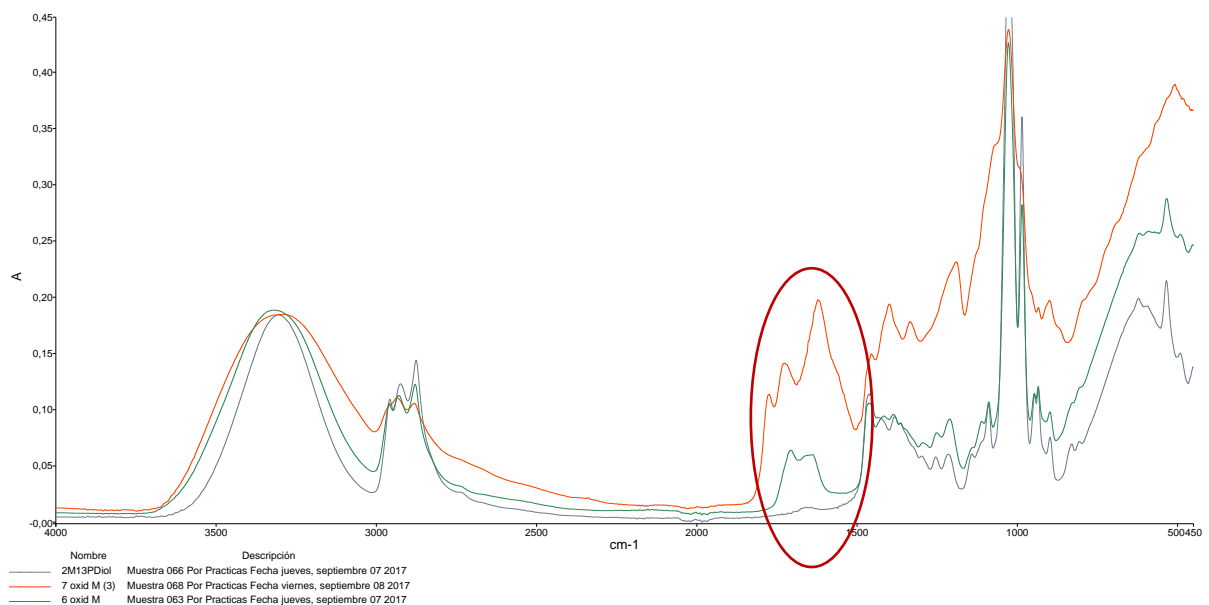


Figura 26. Diagramas obtenidos por FTIR (absorbancia): 2M13PD (gris) vs 6ª Ferm. 2M13PD (verde) vs 7ª Ferm. 2M13PD (naranja)

Para poder admitir que finalmente se ha obtenido el producto deseado se realiza a la muestra una resonancia magnética nuclear o RMN de las sextas fermentaciones para ambos sustratos.

Al igual que antes, para poder interpretar los resultados obtenidos primero se debe observar el diagrama de un RMN del sustrato utilizado.

SDBS-¹H NMRSDBS No. 19339HSP-46-784

C₄H₁₀O₂

2-methyl-1,3-propanediol

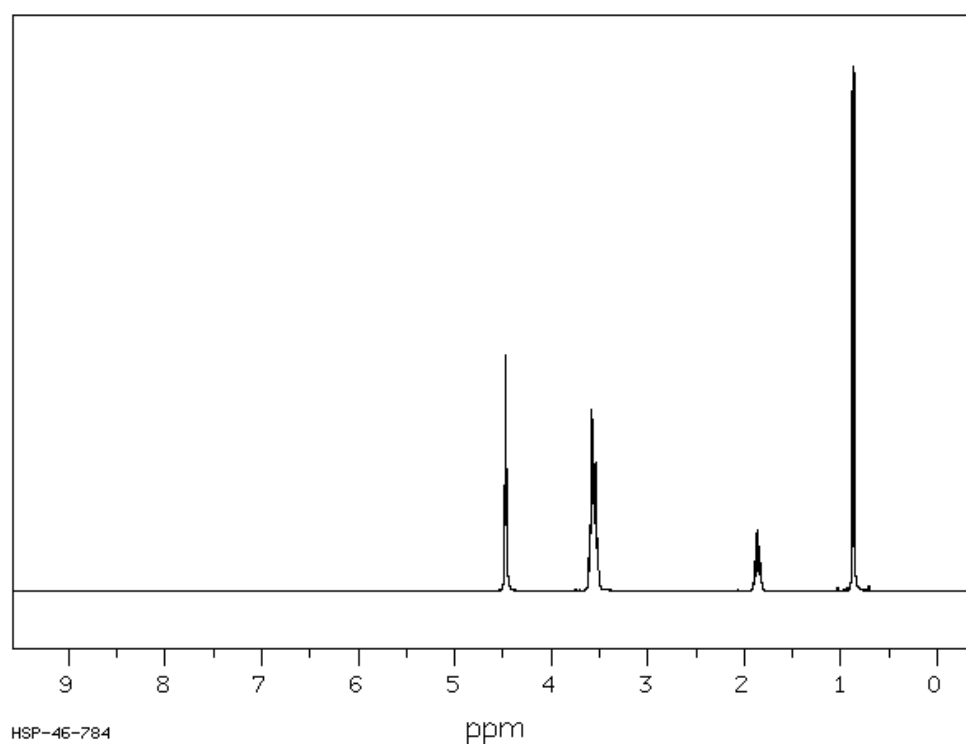
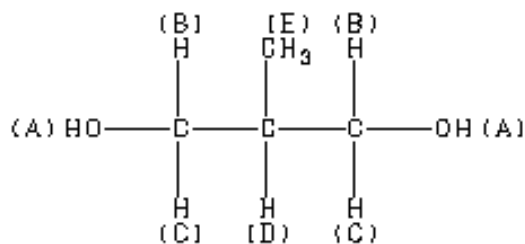


Figura 27. Diagrama RMN de la molécula del 2M13PD

El número de señales que muestra el diagrama nos indica el número de grupos de protones magnéticamente diferentes que posee la molécula, en este caso aparecen cuatro picos diferenciados a simple vista, aunque hay dos muy juntos en 3,55 y 3,58 ppm pertenecientes a los dos –CH₂, por lo que realmente hay cinco picos, que se relacionan con la molécula del 2M13PD como muestra la siguiente figura.



| Assign. | | Shift (ppm) |
|---------|----|-------------|
| A | | 4.47 |
| B | *1 | 3.58 |
| C | *1 | 3.55 |
| D | | 1.858 |
| E | | 0.869 |

Figura 28. Relación entre los picos observados en RMN y la molécula de 2M13PD

Una vez realizado el RMN a la muestra obtenida en la sexta fermentación del 2M13PDse obtiene el siguiente diagrama:

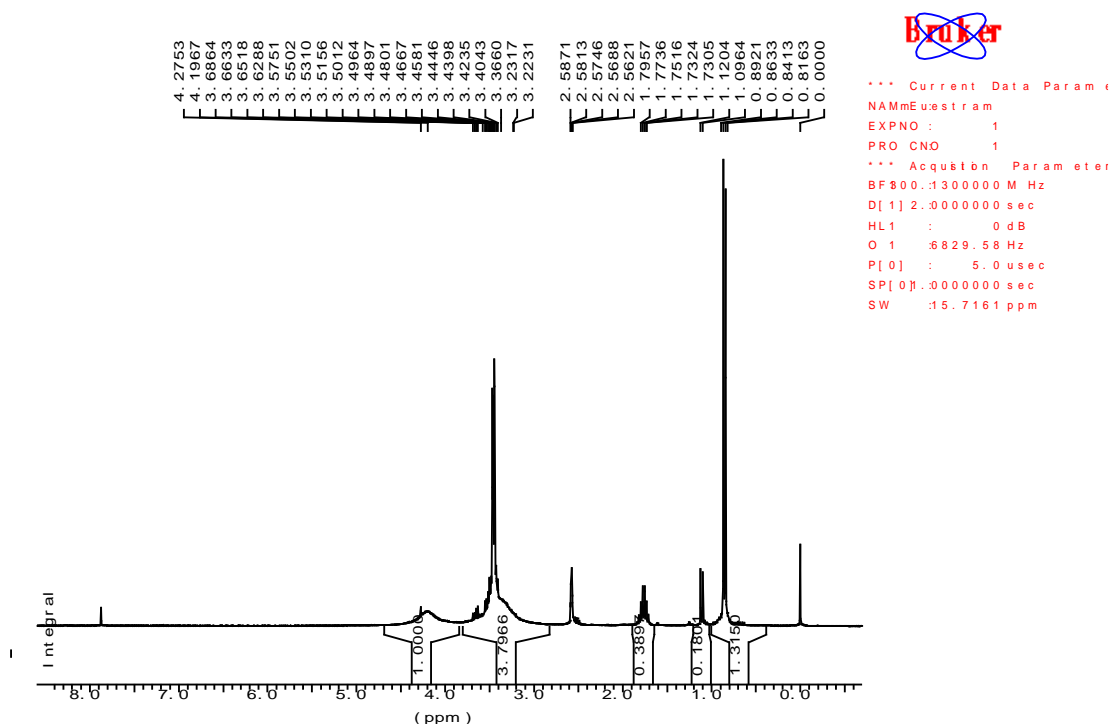
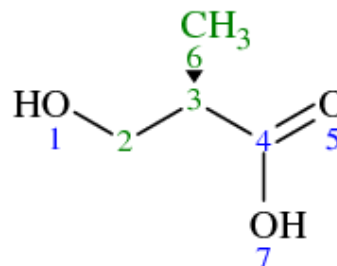


Figura 29. Diagrama obtenido por RMN de la 6ª Ferm. 2M13PD

En el diagrama obtenido se observan varios picos, algunos de ellos son los mismos que los pertenecientes al sustrato, lo que nos dice que sigue estando presente y que no ha

reaccionado totalmente y, para identificar el resto de picos debemos ver primero el diagrama de RMN perteneciente a la molécula del producto de interés, el ácido 2-metil-3-hidroxiisobutanoico, que se muestra a continuación.

(R)-3-Hydroxyisobutyric acid
HMDB00336
 ^1H NMR Spectrum: 500MHz in H_2O
Sample: ~50mM in H_2O and pH 7.00
Referenced to DSS



Zoomed ^1H NMR Spectrum

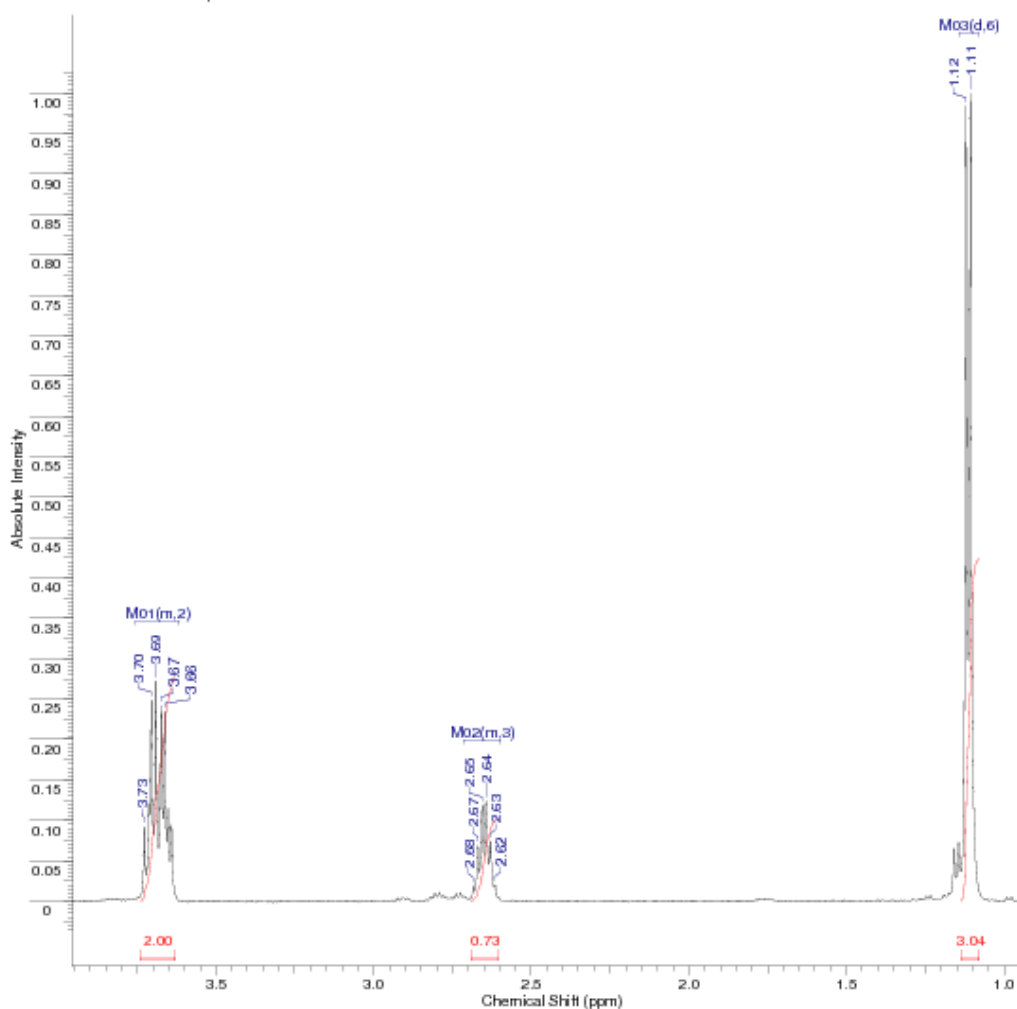


Figura 30. Diagrama RMN de la molécula de 3H2MPA

Se puede ver, que si se comparan ambos diagramas aparecen estos nuevos picos en la muestra analizada y, si se mira el diagrama del sustrato y el diagrama de la muestra

analizada, el pico que antes se mostraba en los 4,47 ppm perteneciente al grupo alcohol –OH, ya casi no se muestra en el diagrama. Por lo que, se puede concluir, que se ha obtenido el ácido deseado a partir del producto de partida mediante la fermentación bacteriana con *Gluconobacter oxydans*, que era el objetivo principal de este proyecto.

Al igual que antes, se analiza también la muestra de la sexta fermentación del glicerol para ver si con este sustrato se puede obtener también un resultado satisfactorio.

El diagrama RMN perteneciente a la molécula de glicerol para poder comparar los picos obtenidos es el siguiente.

SDBS-¹H NMR SDBS No. 2517HSP-47-706

C₃H₈O₃

glycerol

399.65 MHz

0.05 ml : 0.5 ml DMSO-d₆

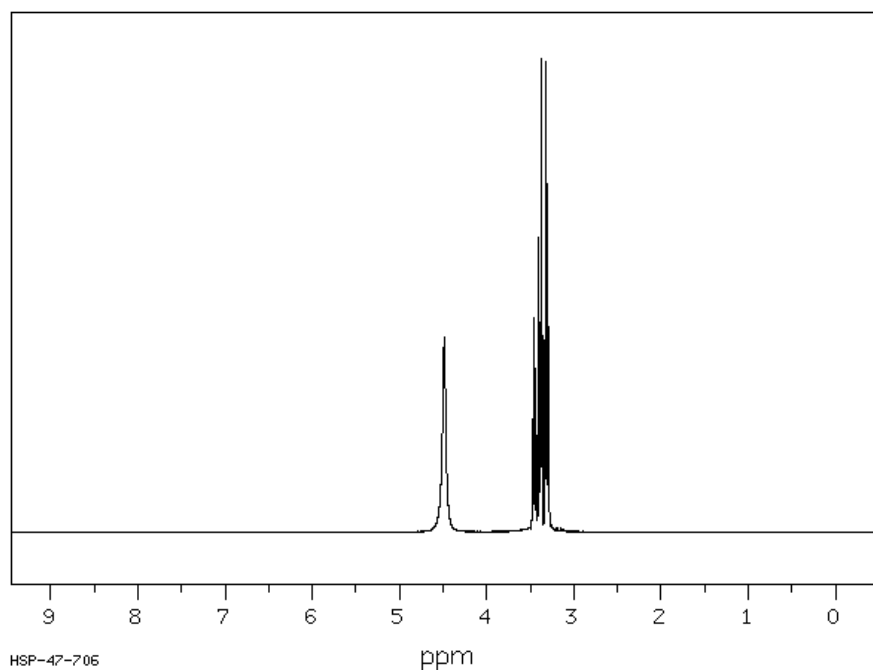
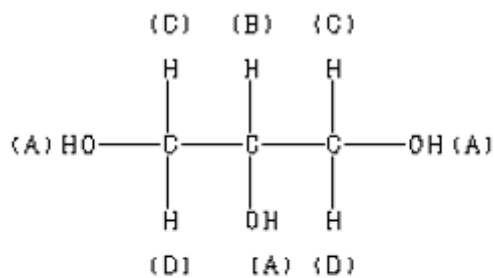


Figura 31. Diagrama RMN de la molécula del glicerol

La relación entre los picos que se muestran y la molécula de glicerol aparece recogidas en la siguiente figura.



| Assign. | | Shift (ppm) |
|---------|----|-------------|
| A | | 4.48 |
| B | | 3.448 |
| C | *1 | 3.382 |
| D | *1 | 3.310 |

Figura 32. Relación entre los picos observados en RMN y la molécula de glicerol

También, al igual que para el anterior caso se obtiene información del RMN de la molécula del producto que daría este otro sustrato, el ácido glicérico.

SDBS-¹H NMR SDBS No. 999HPM-00-616
 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_4$
DL-glyceric acid

300 MHz
 0.05 ml : 0.5 ml DMSO-d₆

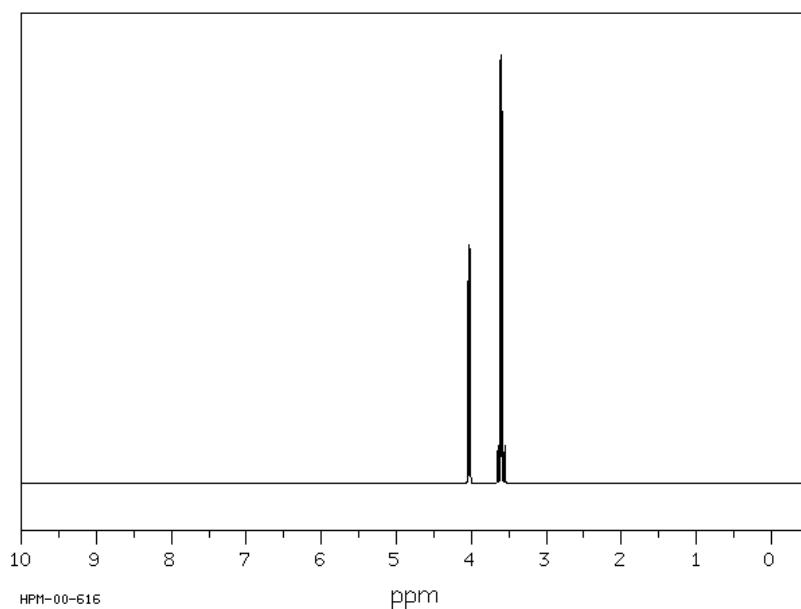


Figura 33. Diagrama RMN de la molécula de ácido glicérico

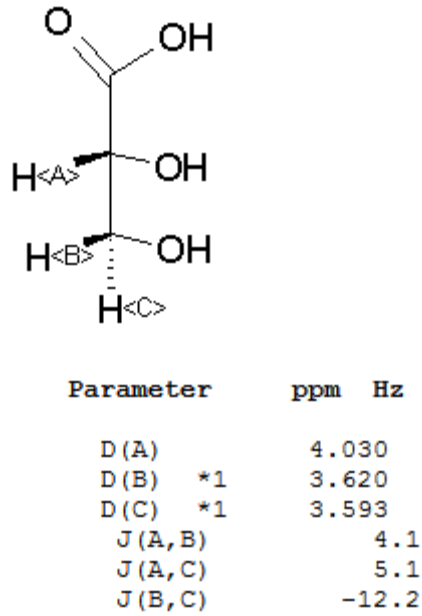


Figura 34. Relación entre los picos observados en RMN y la molécula de ácido glicérico

Por lo que, una vez obtenido estos datos, se puede analizar los resultados obtenidos por RMN de la muestra de la sexta fermentación del glicerol.

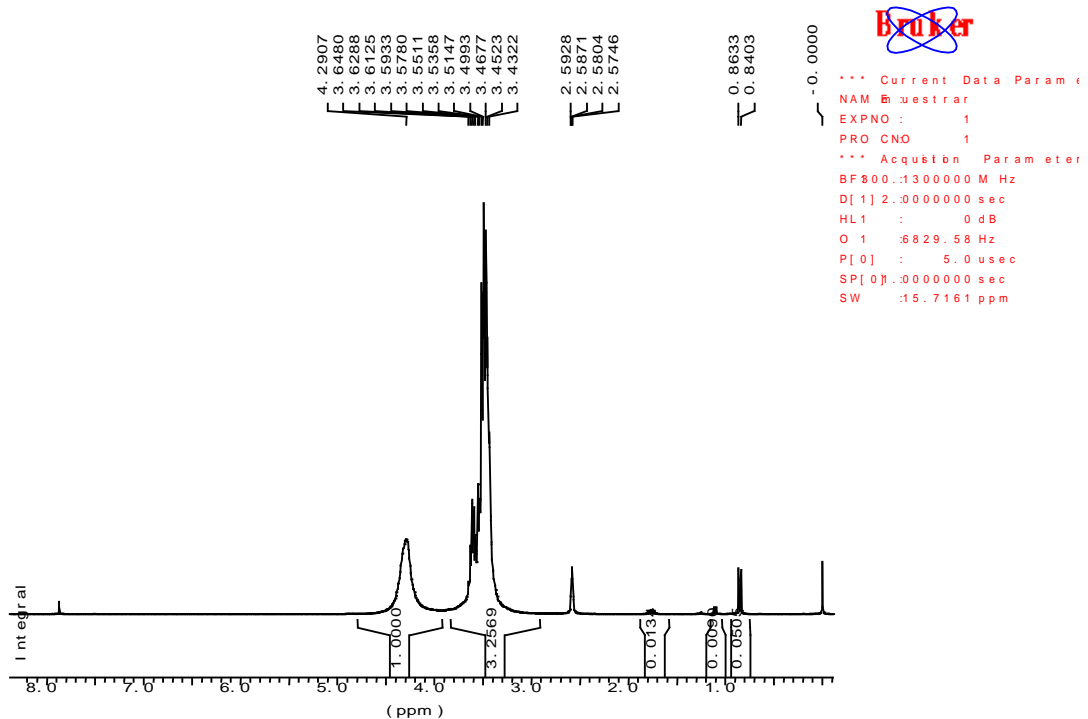


Figura 35. Diagrama obtenido por RMN de la 6ª Ferm glicerol

En este caso, el diagrama obtenido es muy parecido al del sustrato inicial, cierto es, que aparecen nuevos picos pero en muy poca cantidad, por lo que, en este caso no se puede asegurar que se haya obtenido el ácido glicérico en la fermentación bacteriana por el uso de *Gluconobacter oxydans*.

6. CONCLUSIONES

La utilización de la bacteria *Gluconobacter oxydans* (DSM 50049) para la oxidación incompleta de alcoholes mediante la fermentación y la posibilidad de producción de *building blocks* interesantes para un gran número de procesos, en concreto, en este proyecto, la producción del ácido 2-metil-hidroxiopropanoico, precursor del ácido metacrílico, en un proceso batch a escala de laboratorio ha sido satisfactoria para la obtención de una cantidad significativa del producto de interés a un rendimiento del 20-30%.

Los resultados obtenidos por espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear muestran que realmente se ha conseguido obtener el ácido 2-metil-hidroxiopropanoico en pequeñas cantidades. El bajo rendimiento se debe a la alta temperatura ambiente en la que se realizaron los experimentos y el poco tiempo disponible para trabajar y mejorar las condiciones de operación.

Este proyecto confirma y proporciona una ruta alternativa para la síntesis de ácido metacrílico a partir de un subproducto industrial de bajo coste, que mejorando el proceso y el rendimiento podría ser muy interesante en el futuro de la producción de una sustancia con gran importancia en el sector plástico y farmacéutico, con un menor impacto para el medio ambiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jungmeier, G., de Jong, E., *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*, Chapter 1, *Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries*, 2015, Elsevier B.V.
- [2] Cherubini, F., *The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals*, 2010, *Energy Conversion and Management*, Elsevier.
- [3] BIOENAREA, *Biorrefinerías, una oportunidad de negocio para las zonas rurales y las industrias*, <http://www.bioenarea.eu/>.
- [4] Quesada et al., *THE BIOMASS AS ALTERNATIVE TO PETROLEUM FOR CHEMICAL PRODUCTS OBTENTION: ACETONE AND ETHANOL AS PLATFORM MOLECULES*, 2014, *Avances en Ciencias e Ingeniería*.
- [5] Walsh, P., de Jong, E., Wellish, M., Higson, A., *Bio-Based Chemicals: Value Added Products From Biorefineries*, 2012, IEA Bioenergy.
- [6] Madigan, Michael T., Martinko, John M., Dunlap, Paul V., Clark, David P., *BROCK. BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS*, 2009, PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- [7] Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología EE.UU., *MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL*, 2006, Organización de los Estados Americanos.
- [8] Gupta, A., Singh, Vinay K., Qazi, G.N., Kumar, A., *Gluconobacter oxydans: Its Biotechnological Applications*, 2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 445-456.
- [9] Sang-Hyun Pyo et al., *A new route for the synthesis of methacrylic acid from 2-methyl-1,3-propanediol by integrating biotransformation and catalytic dehydration*, 2012, *Green Chemistry*, Vol. 14, 1942-1948.
- [10] Molinari, F., Gandolfi, R., Villa, R., Urban, E., Kiener, A., *Enantioselective oxidation of prochiral 2-methyl-1,3-propanediol by Acetobacter pasteurianus*, 2003, *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol. 14, 2041-2043.

- [11] Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Higton, G., *Industrial Microbiology An introduction*, 2010, London, Blackwell Science.
- [12] León, R., Prazeres, D. M. F., Fernandes, P., Molinari, F., Cabra, J. M. S. I., *A Multiphasic Hollow Fiber Reactor for the Whole-Cell Bioconversion of 2-Methyl-1,3-propanediol to (R)- β -Hydroxyisobutyric Acid*. *Biotechnology Progress*, 2001, Vol. 17, 468-473.
- [13] Ohta, H., Tetsukawa, H., Noto, N., *Enantiotopically Selective Oxidation of α,ω -Diols with the Enzyme Systems of Microorganisms*, 1982, The Journal of Organic Chemistry, Vol. 47, 2400-2404.
- [14] Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A., *Gluconobacter oxydans: Its Biotechnological Applications*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2001, Vol. 3, 445-456.
- [15] Macauley, S., McNeil, B., Harvey, Linda M., *The Genus Gluconobacter and its Applications in Biotechnology*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2001, Vol. 21, 1-25.
- [16] Loring Coes, Jr., *Manufacture of methacrylic acid*, Du Pont, Estados Unidos, US2379625. 3-07-1945.
- [17] Goodhue, Charles T., Schaeffer, James R., *Preparation of L (+) P-Hydroxyisobutyric Acid by Bacterial Oxidation of Isobutyric Acid*, 1971, *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 13, 203-214.
- [18] Shimazaki, M., Hasegawa, J., Kan, K., Nomura, K., Nose, Y., Kondo, H., Ohashi, T., Watanabe, K., *Synthesis of Captopril starting from an Optically Active β -Hydroxy Acid*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1982, Vol. 30, 3139-3146.
- [19] Robinson, William G., Coon, Minor J., *Synthesis of Malonic Semialdehyde, B-Hydroxypropionate and B-Hydroxyisobutyrate*. *Methods in enzymology*, 1963, Vol. 6, 549-553.

- [20] Kim, C. H., Hong, W. K., Lee, I. Y., Choi, E. S., Rhee, S. K., *Enhanced production of D-β-hydroxyisobutyric acid through strain improvement*, 1999, *Journal of Biotechnology*, Vol. 69, 75-79.
- [21] Choy, W., Ma, P., Masamune, S., *Enantioselective synthesis of b-hydroxyisobutyric acid: a useful synthon in the synthesis of polypropionate-type natural products*, 1981, *Tetrahedron Letters*, Vol. 22, 3555 - 3556.
- [22] Hasegawa, J., Ogura, M., Hamaguchi, S., Shimazaki, M., Kawaharada, H., Watanabe, K., *Stereospecific conversion of isobutyric acid to D-beta-hydroxyisobutyric acid by microorganism. Journal of fermentative technology*, 1981, Vol. 59, 203-208.
- [23] Lee, I. Y., Kim, C. H., Yeon, B. K., Hong, W. K., Choi, E. S., Rhee, S. K., Park, Y. H., Sung, D. H., Baek, W. H., *High production of D-β-hydroxyisobutyric acid from methacrylic acid by Candida rugosa and its mutant*, 1997, *Bioprocess Engineering*, Vol. 16, 247-252.
- [24] Lee, Y., Hong, W. K., Hwang, Y. B., Kim, C. H., Choi, E. S., Rhee, S. K., Park, Y. H., *Production of D-β-Hydroxyisobutyric Acid from Isobutyric Acid by Candida rugosa*, 1996, *Fermentation and bioengineering*, Vol. 81, 79-82.
- [25] Ohta, H., Tetsukawa, H., *Enantiotopically selective oxidation of 1,3-diols with a microorganism*, 1979, *Chemistry Letters*, Vol. 8, 1379-1380.
- [26] Diversas fotografías extraídas del dominio público de Wikipedia, [En línea], <http://www.wikipedia.org>, Consultadas septiembre 2017.
- [27] Universidad politécnica de Cataluña, Diversos apuntes consultados de Máster en Ingeniería Química.
- [28] The Human Metabolome Database (HMDB), disponible para consulta en <http://www.hmdb.ca/>.