

Disseny d'un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana

Treball de final de grau



Laia Tort Agell

Grau en Enginyeria Química

Tutor: Jordi Bou

Setembre 2016

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona

Resum

L'objectiu principal d'aquest treball és el de dissenyar un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana.

Per assolir aquest objectiu ha estat necessària una introducció teòrica de quatre punts clau; els materials compostos, la cel·lulosa bacteriana, l'obtenció de la mateixa i els diferents tipus de fermentadors.

En aquest primer bloc teòric explica doncs, resumidament, l'origen de la cel·lulosa bacteriana, una cel·lulosa produïda per alguns bacteris mitjançant la fermentació que consta d'unes propietats superiors a la cel·lulosa vegetal. Aquest fet la fa òptima per a compondre materials compostos, els quals són la principal aplicació de la cel·lulosa bacteriana. S'expliquen també els precedents històrics que es tenen de la mateixa i com influeixen una sèrie de factors en la seva producció; el carboni, el nitrogen, el pH, i la temperatura entre d'altres.

Per altra banda es citen i s'expliquen els principals fermentadors; discontinus, alimentats, continus, tubulars i d'altres utilitzats anteriorment en la producció de cel·lulosa bacteriana.

Arribat a aquest punt, l'estudi consta d'una base teòrica suficient per començar el disseny del bioreactor. En base a estudis d'altres autors, es recopilen els diferents valors de paràmetres com el subministrament d'oxigen, la temperatura, el pH, l'inòcul, l'esterilització del medi, el substrat, la durada del cicle, la producció i el rentat del producte per elegir el valor òptim pel reactor que es vol dissenyar; un reactor a nivell planta pilot amb una producció anual de 300 Kg.

A continuació es mostren les condicions essencials d'operació del fermentador, els plànols, els rendiments i la seguretat.

S'ha fet també un estudi econòmic, un estudi ambiental i una planificació del projecte.

L'estudi conclou amb l'assoliment dels objectius; la viabilitat de realitzar el reactor que s'ha dissenyat, a escala planta pilot, tenint en compte que els càlculs de producció i rendiment són orientatius.

Sumari

RESUM	2
SUMARI	3
1.INTRODUCCIÓ	5
a) Motivació de l'estudi.....	5
b) Abast de l'estudi.....	5
c) Teoria 1: Materials compostos.....	6
C.1.- Què és un material compost?	6
C.2.- Classificació dels materials compostos.....	7
C.3.- Materials compostos reforçats amb partícules	7
C.4.- Materials compostos reforçats amb fibres	9
d) Teoria 2: La cel·lulosa bacteriana	14
D.1.- Què és la cel·lulosa?	14
D.2.- Tipus de cel·lulosa.....	16
D.3.- La cel·lulosa bacteriana; caracterització i propietats	18
D.4.- Aplicacions de la cel·lulosa bacteriana	22
e) Teoria 3: obtenció de cel·lulosa bacteriana.....	25
E.1.- Precedents històrics.....	26
E.2.- Influència de les fonts de carboni	27
E.3.- Influència de les fonts de nitrogen.....	30
E.4.- Influència del pH, la temperatura i altres aspectes	30
E.5.- Cultiu estàtic i cultiu agitat	31
f) Teoria 4: tipus de fermentadors.....	32
F.1.- Factors físico-químics que afecten al rendiment de les fermentacions industrials	33
F.2.- Fermentació batch (discontínua)	38
F.3.- Fermentació alimentada (fed-batch).....	43
F.4.- Fermentació contínua (CSTR).....	45
F.5.- Fermentació amb reactors tubulars.....	51
F.6.- Fermentadors utilitzats per a la producció de BC	57
2. OBJECTIUS	60
a) Objectiu general	60
b) Objectius particulars.....	60
3. MATERIALS I EQUIPS	61

4. RESULTATS	61
a) Subministrament D'oxigen	61
B) Temperatura.....	62
C) Ph	63
D) Creació De L'inòcul I Esterilització Del Medi	63
E) Substrat, Durada I Producció De Cada Cicle	64
F) Rentat Del Producte.....	70
Selecció De Les Condicions Òptimes	70
A) Oxigen Dissòlt	70
B) Temperatura.....	71
C) Ph	71
D) Creació De L'inòcul I Esterilització Del Medi	71
E) Substrat, Durada I Producció De Cada Cicle	71
F) Rentat Del Producte.....	72
Equacions Involucrades	74
A) Cinètica De La Reacció [43] [44]	74
B) Capacitat De Producció	77
C) Volum Del Fermentador Necessari Per A La Producció Establerta	77
Disseny del fermentador.....	80
a) Condicions essencials d'operació	80
b) Parts essencials del fermentador	80
c) Disseny.....	87
d) Rendiment.....	94
e) Seguretat.....	95
5. ESTUDI ECONÒMIC	97
6. ESTUDI AMBIENTAL	98
7. PLANIFICACIÓ DEL PROJECTE	100
8. CONCLUSIONS	99
9. AGRAÏMENTS	100
10. BIBLIOGRAFIA	101

1.Introducció

a) Motivació de l'estudi

Actualment, l'extracció de cel·lulosa d'origen vegetal presenta diverses dificultats. La seva producció és lenta i no arriba a cobrir les demandes requerides per noves aplicacions. Per altra banda, la seva extracció o separació del vegetal és costosa ja que cal eliminar altres compostos com la lignina, l'hemicel·lulosa i olis, entre d'altres. Aquest procés de separació genera un impacte ambiental no desitjat en utilitzar-se diferents dissolvents tòxics i generar subproductes.

Per aquestes raons moltes investigacions s'han centrat en la producció de cel·lulosa bacteriana, una cel·lulosa produïda per bacteris que pot arribar a cobrir la demanda per a noves aplicacions que requereixen cel·lulosa i a més té unes excel·lents propietats mecàniques que la diferencien de la cel·lulosa tradicional amb l'avantatge de ser molt més pura químicament evitant els processos d'extracció.

Per altra banda, la indústria dels materials compostos, materials que permeten obtenir propietats superiors als convencionals seleccionant-ne una combinació adequada de cada un, també requereix cada vegada més productes fets de fonts renovables i sostenibles que siguin biodegradables i que no provenguin del petroli.

Encaixant aquestes dues idees sorgeix la motivació d'aquest estudi, que pretén dissenyar un fermentador per a la producció de cel·lulosa bacteriana per utilitzar-la com a reforç en materials compostos sostenibles.

b) Abast de l'estudi

La utilització de cel·lulosa bacteriana és, doncs, una bona solució per aconseguir nous materials d'altres prestacions amb compostos totalment naturals o sostenibles.

Aquest projecte es centrarà en proposar un disseny d'un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana amb microorganismes d'alta eficàcia (*Gluconacetobacter Xylinum*), no patògens i amb cinètiques controlades. El procés d'obtenció de cel·lulosa bacteriana per aquest mètode pot arribar a ser un substitutiu dels extractius tradicionals ja que, com s'ha dit abans, reuneixen l'ús de reactius químics, maquinària i molt probablement de temps.

c) Teoria 1: Materials compostos

C.1.- Què és un material compost?

Un material compost (o compòsit) és un material heterogeni format per una combinació macroscòpica de dos o més materials que presenta unes propietats superiors als que el constitueixen [1] [2]. El principal avantatge d'aquests rau en la possibilitat de dissenyar i fabricar un material segons unes especificacions exigides [3].

Els compòsits consten d'una matriu (interfase comuna) i d'un reforç. Per una banda, la matriu és l'element que actua com a adhesiu dels diferents components (fase contínua) donant estabilitat al conjunt, transferint les càrregues al reforç, protegint-lo del deteriorament mecànic i químic, i evitant la propagació d'esquerdes. Per altra banda, el reforç és l'element resistent (fase discontinua) del material compost [1][4].

Les matrius d'aquests compòsits solen ser de quatre materials diferents; metàl·liques (MMC; *metal matrix composites*), ceràmiques (CMC; *ceramic matrix composites*), de carboni, i orgàniques (o RP: *reinforced plàstics*).

Els compòsits més comuns i usats actualment són els de matriu orgànica (o matriu polimèrica reforçada) mitjançant fibres.

Les matrius orgàniques (o polimèriques) poden estar formades de termoplàstics, elastòmers o termostables (o resines), sent aquests últims els més utilitzats en els materials compostos d'altres prestacions.

Dins del grup de les resines, s'utilitzen diferents materials com a matriu; epoxis (les d'ús més general en altes prestacions, amb una temperatura màxima d'ús al voltant dels 170°C), bismaleimides (o BMI, per altes temperatures de fins a 250°C), poliamides (també utilitzades per a altes temperatures de fins a 300°C), fenòliques (resistents al foc), polièsters (poc utilitzades per les seves baixes característiques mecàniques) i cianoèsters (utilitzades en aplicacions radioelèctriques, presenten una baixa absorció d'humitat), entre d'altres [4].

C.2.- Classificació dels materials compostos

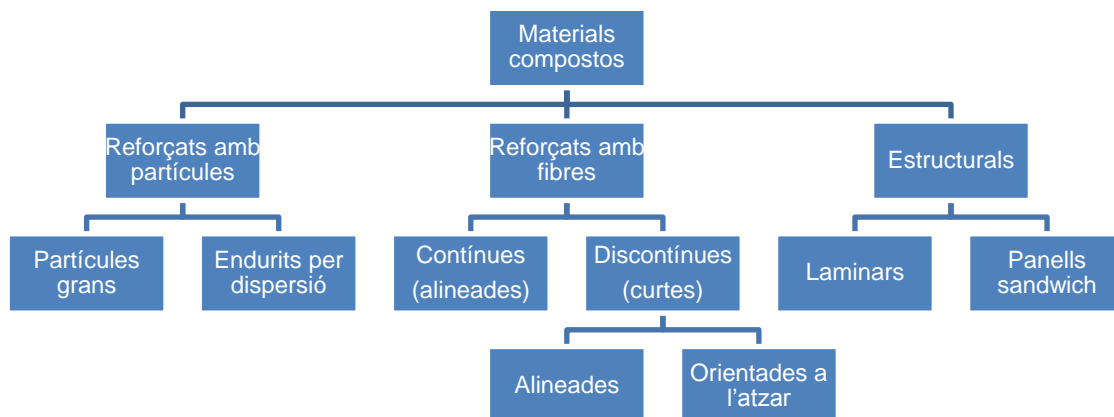


Figura 1: Classificació dels materials compostos

Els materials compostos es classifiquen bàsicament en tres grans grups en funció dels reforços que els formen; els compòsits reforçats amb partícules, els compòsits reforçats amb fibres i els compòsits estructurals, tal i com es mostra a la Figura 1 [5].

Els compòsits reforçats amb partícules són equiaxials, és a dir, les dimensions de les partícules són aproximadament les mateixes en qualsevol direcció. Per altra banda, en els compòsits reforçats amb fibres la fase dispersa té una geometria d'una gran relació de longitud-diàmetre. Els compòsits estructurals, són combinacions de materials compostos amb materials homogenis [5].

C.3.- Materials compostos reforçats amb partícules

Dins dels materials reforçats amb partícules se'n poden distingir dos grups diferents; els endurits per dispersió i els de partícules grans.

En el cas dels materials compostos reforçats amb partícules grans, el terme gran fa referència al mecanisme de reforç indicant que la interacció matriu-partícula no és a nivell molecular. En aquests tipus de compòsits normalment la partícula és més rígida i més dura que la matriu, i aquesta transmet part de la càrrega aplicada a la partícula. El grau de reforç o comportament mecànic depèn d'una forta unió entre matriu i partícula.

Aquesta tècnica de reforç s'utilitza molt en materials polimèrics per millorar-ne les propietats o bé reemplaçar part del volum del polímer per un material més econòmic (un bon exemple és el cautxú amb carbó negre per neumàtics, tal com es mostra en la Figura 2), però s'usa també en materials metàl·lics i ceràmics [5] [6].



Figura 3: Estructura del formigó

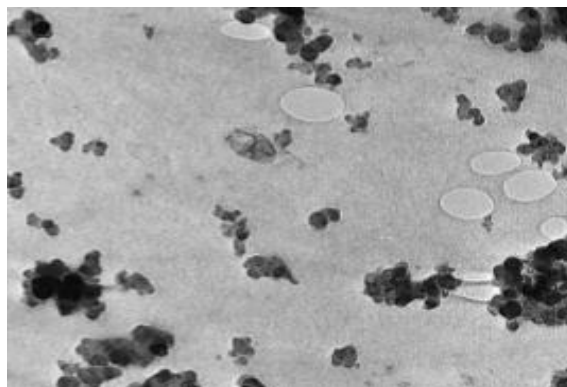


Figura 2: Estructura cautxú per a neumàtics

L'exemple més comú és el formigó; amb una matriu de ciment i partícules de grava o sorra que en reforcen les propietats. En aquest cas, tant la matriu com el reforç són materials ceràmics. En la Figura 3 es pot veure la macroestructura del formigó, distingint-se clarament la frontera entre la matriu de les partícules [5].

Altres exemples típics d'aquests materials serien els carburs sinteritzats per fer eines de tall, que contenen partícules ceràmiques dures en una matriu metàl·lica, els contactes elèctrics d'interruptors de bona resistència al desgast, (per exemple aliatges de W-Ag), etc. [6].

Els materials compostos endurits per dispersió tenen les partícules més petites que en el primer cas, amb diàmetres al voltant de 10 a 100 nanòmetres i la interacció partícula-matriu succeeix a nivell molecular. En aquest cas, la majoria de la càrrega aplicada la rep la matriu, mentre que les partícules impedeixen el moviment de les dislocacions, impeding la deformació plàstica i per tant augmentant la duresa del material [5].

Els metalls i els aliatges metàl·lics solen reforçar-se mitjançant dispersió de partícules fines i inertes, metàl·liques o bé no metàl·liques. Normalment s'utilitzen diferents òxids. Aquest procés requereix altes temperatures ja que, com s'ha comentat, les partícules s'elegeixen perquè no reaccionin amb la matriu [5].

Així doncs, la fase dispersa d'aquests compòsits és, generalment, un òxid dur i estable que ha de fer d'obstacle contra el lliscament. El material dispers, per altra banda, ha de tenir una mida, forma, distribució i quantitat òptimes, i ha de tenir una baixa solubilitat dins la matriu (no hi ha d'haver reaccions químiques) [6].

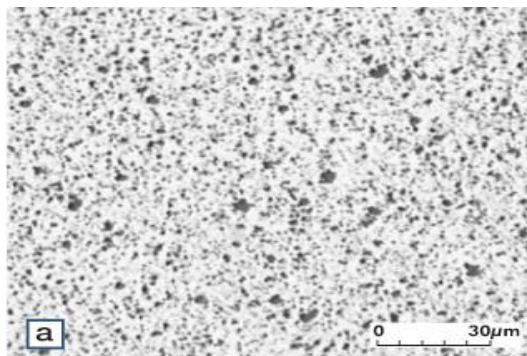


Figura 4: Estructura de l'Ag-CdO

Alguns materials compostos obtinguts per enduriment per dispersió i les seves aplicacions els podem trobar a la Taula 1. En la Figura 4 es mostra l'estructura de l'Ag-CdO on es pot veure clarament la distinció entre les partícules i la matriu [6].

MATERIAL	APLICACIÓ
Ag-CdO	Materials per contactes elèctrics
Be-BeO	Tecnologia aeroespacial i nuclear
Ni-20% Cr-ThO ₂	Components per turbomotors
Pt-ThO ₂	Filaments, components elèctrics
W-ThO ₂ , ZrO ₂	Filaments, calefactores

Taula 1: Materials compostos obtinguts per enduriment per dispersió i aplicacions

C.4.- Materials compostos reforçats amb fibres

Els composts més importants en el camp de la tecnologia són els compostos reforçats amb fibres. Aquests composts milloren la resistència, la càrrega de ruptura, la rigidesa, la relació resistència/pes, i es diferencien dels compostos reforçats per partícules ja que la resistència d'aquests augmenta tant a temperatura ambient com a altes temperatures [7].

Tal i com es mostra a la Figura 1, els composts reforçats amb fibres es divideixen en els de fibres contínues alineades i en els de fibres discontinües (o curtes). Aquestes últimes es divideixen en fibres alineades i fibres orientades a l'atzar. Així doncs, aquests composts es classifiquen en funció de la llargada de la fibra.

Un factor important per a la resistència en els composts reforçats per fibres és la unió entre la fibra i la matriu, ja que quan s'aplica una càrrega, la matriu es deforma sense aplicar-la als extrems de la fibra, tal com es mostra en la Figura 5. Per tant, això provoca que perquè hi hagi certa efectivitat en quant a rigidesa i resistència, les fibres hagin de tenir una llargada crítica a partir de la qual seran eficaces com a reforç[5].

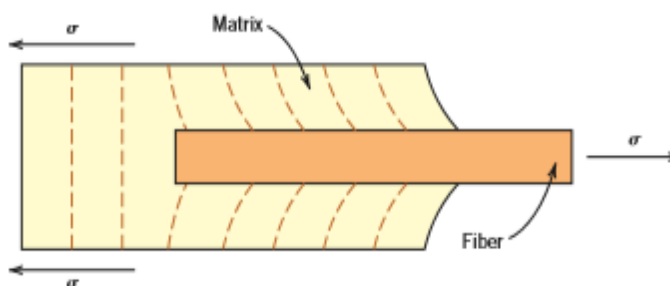


Figura 5: Patró de la matriu subjectant la fibra amb una càrrega aplicada

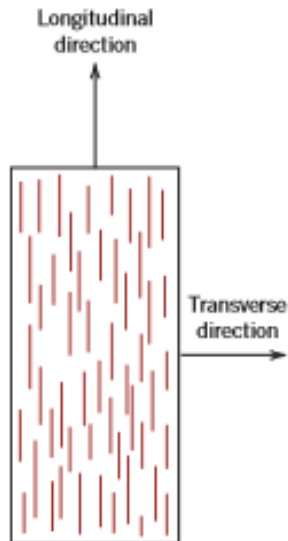


Figura 6: Esquema de fibres contínues alineades

Les característiques mecàniques d'aquests materials, però, no depenen només de la llargada de les fibres, sinó de l'orientació d'aquestes enfront la càrrega aplicada sobre la matriu.

En el cas dels materials amb fibres contínues alineades (Figura 6), les fibres són llargues i paral·leles a l'eix longitudinal. Les propietats mecàniques d'aquest tipus de fibres depenen de diferents factors, entre els quals, el comportament tensió-deformació tant de la fibra com de la matriu, les fraccions en volum de cada un, o la direcció en la qual s'aplica la càrrega. A més, les propietats d'aquests tipus de compòsits són molt anisòtropes; depenen de la direcció en la que es mesurin.

Considerem la situació en que es consta d'una matriu dúctil, d'unes fibres fràgils, i la càrrega s'aplica en la direcció longitudinal (tal com es mostra en la Figura 6).

En uns primers instants de temps, tant la fibra com la matriu pateixen una deformació elàstica. A mesura que l'esforç roman, la matriu cedeix i comença a deformar plàsticament, mentre que la fibra segueix deformant elàsticament.

La fallada del compòsit succeeix quan les fibres es comencen a trencar. Aquesta fallada, però, no és crítica ja que la ruptura de les fibres es produeix de manera gradual i després de la fractura total de les fibres la matriu segueix intacta i capaç de suportar encara una petita càrrega mentre segueix deformant-se plàsticament [5].

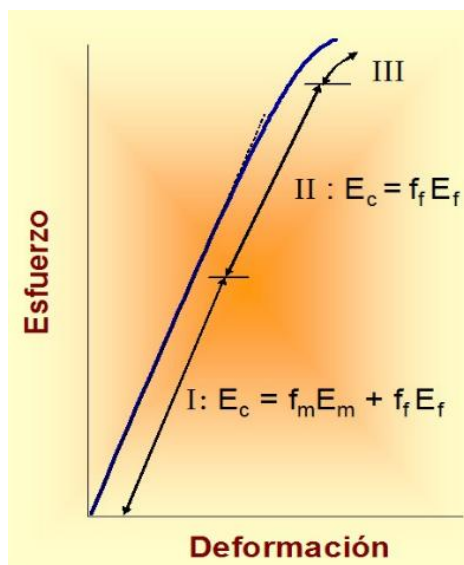


Figura 7: Gràfica tensió-deformació d'un compost reforçat per fibres

En la Figura 7 es mostra la corba tensió-deformació per un compost reforçat amb fibres. Quan s'aplica una càrrega paral·lela a les fibres, es pot predir molt bé el mòdul elàstic quan ens trobem amb baixos valors d'esforç (ja que per valors més elevats la matriu es deforma i la corba deixa de ser lineal) [7].

Si considerem la situació contrària, una càrrega aplicada en direcció transversal (tal com es mostra en la Figura 6), el que succeeix és ben diferent. En aquestes circumstàncies, la fallada del material es produeix inclús per sota del punt de ruptura de la matriu, fent que les fibres reforç provoquin un efecte contrari al desitjat. Tot i això, no és un cas crític ja que els aquests compostos es dissenyen tenint en compte que la càrrega s'aplicarà longitudinalment, i no transversalment [5].

Dins de la classificació de materials reforçats amb fibres discontinües hi trobem el cas en què les fibres estan alineades, o bé orientades a l'atzar. Aquestes fibres tenen una llargada menor a la llargada crítica.

Tot i que l'eficiència del reforç en el cas de les fibres discontinües és menor que en les fibres contínues, els composts formats per fibres discontinües estan guanyant cada cop més importància a nivell comercial.



Figura 8: Esquema de fibres discontinües alineades



Figura 9: Esquema de fibres discontinües orientades a l'atzar

Les fibres de vidre discontinües alineades (Figura 8) poden tenir mòduls d'elasticitat i resistències a la tensió al voltant del 90% i 50% respectivament dels seus anàlegs de fibres contínues, però aporten avantatges ja que són més barates, més ràpides de fabricar i més fàcils d'implementar en geometries complexes [8].

Les fibres orientades a l'atzar (Figura 9) també consten d'una menor eficiència respecte les fibres contínues, però d'aquesta manera s'aconsegueix que el material sigui à isotròpic (les propietats del compòsit seran independents de la direcció en la que s'apliqui la càrrega) i el cost també és menor [8].

Dins dels polímers reforçats amb fibres, cal posar èmfasi en la fibra de vidre i la fibra de carboni; dos materials que estan revolucionant el camp de la tecnologia.

La fibra de carboni és un material que consta de fibres al voltant de 5 i 10 micròmetres de diàmetre, fetes d'àtoms de carboni cristal·litzats i alineats que donen a la fibra una gran resistència.

Aquestes fibres aporten un munt d'avantatges, entre d'altres una elevada lleugeresa, una gran capacitat de dissipació d'energia davant d'un xoc (les fibres es desintegren mentre que un metall només es deformaria), no pateixen cap tipus de dilatació amb l'augment de temperatura, sent capaces d'aguantar fins a 1000°C, i són resistents a la corrosió i a la fatiga.

Tot i així, són més cares que altres fibres d'ús comú (fibra de vidre), molt bones conductores de l'electricitat, cosa que no sempre és un avantatge, i la seva manufactura és costosa en comparació amb altres compòsits [9].

Per altra banda, la fibra de vidre també és dels compòsits més utilitzats per la seva bona relació qualitat preu. Aquest material té un baix cost comparat amb la fibra de carboni, una elevada lleugeresa, gran resistència a la humitat i a l'atac químic d'àcids i solvents, és un bon aïllant elèctric i és més resistent a l'alta temperatura que la fibra de carboni. Totes aquestes qualitats el fan el material ideal per a grans estructures com ara

embarcacions o turbines de vent, entre d'altres. Tot i això, no és tant resistent com la fibra de carboni [9].

Per tant, és d'esperar que les aplicacions dels compostos reforçats amb fibres abracin un munt de camps diferents. En automoció, l'aplicació d'aquests materials ha sigut molt gradual degut al seu alt cost, i només s'han utilitzat fins ara en els cotxes de competició sobretot amb fibres de carboni. En el camp aeroespacial, els compòsits de fibra de carboni són molt comuns tant en avions comercials com militars; el Boeing 787 i Airbus A350 XWB tenen al voltant del 50% de la seva estructura feta de materials compostos. La fibra de carboni s'empra també helicòpters, motors de coets, satèl·lits i turbines.

La fibra de vidre també és un material molt utilitzat en vaixells de tot tipus sent més barata que la fibra de carboni i aportant unes grans propietats.

En el món de l'esport aquests materials també s'han anat implementant amb el temps, degut a la seva lleugeresa i rigidesa [9].

L'últim tipus de material compost que trobem a la classificació de la Figura 1, són els materials compostos estructurals. Aquests es subclassifiquen bàsicament en laminars i en panells *sandwich*. Aquests materials normalment estan formats de compòsits i materials homogenis, fent que les propietats d'aquests no depenguin només dels materials que el formen sinó de la geometria amb la qual estan col·locats.

Els compòsits laminars estan compostats de dues làmines bidimensionals o panells que tenen una direcció preferent d'alta resistència tal com passa amb la fusta i amb els compòsits reforçats amb fibres contínues i alineades. Aquestes làmines es posen una sobre l'altre alternant la direcció preferent. Això provoca que el compòsit tingui una alta resistència en qualsevol direcció del pla bidimensional, però tot i així la resistència no és la mateixa que si les fibres s'orientessin totes en la mateixa direcció. Un dels objectes quotidians en els que trobem aquest tipus de material compost és en els esquís, entre d'altres accessoris esportius.

Els panells *sandwich*, l'altre tipus de compòsit estructural, consisteixen en dues làmines separades per un adhesiu i un nucli. Les làmines exteriors normalment estan fetes d'aliatges d'alumini o de plàstics reforçats per fibres, titani o acer. Aporten alta resistència i duresa a l'estructura i cal que siguin prou primes com per resistir esforços. El nucli d'aquests compòsits sol estar fet d'un material lleuger amb un baix mòdul elàstic. Normalment els materials que el formen són espumes polimèriques (epoxi, fenòliques, per exemple), fusta (normalment balsa) i l'estructura de bresques feta amb cel·les hexagonals (*honeycombs*, veure Figura 10).

Estructuralment el nucli ha de servir com a suport de les cares, ha de suportar esforços transversals i ser prou resistent per evitar el vinclament dels panells.

Aquests materials s'utilitzen una gran varietat d'aplicacions que inclouen sostres, terres, parets d'edificis i aplicacions en aviació i aeroespacial [5].

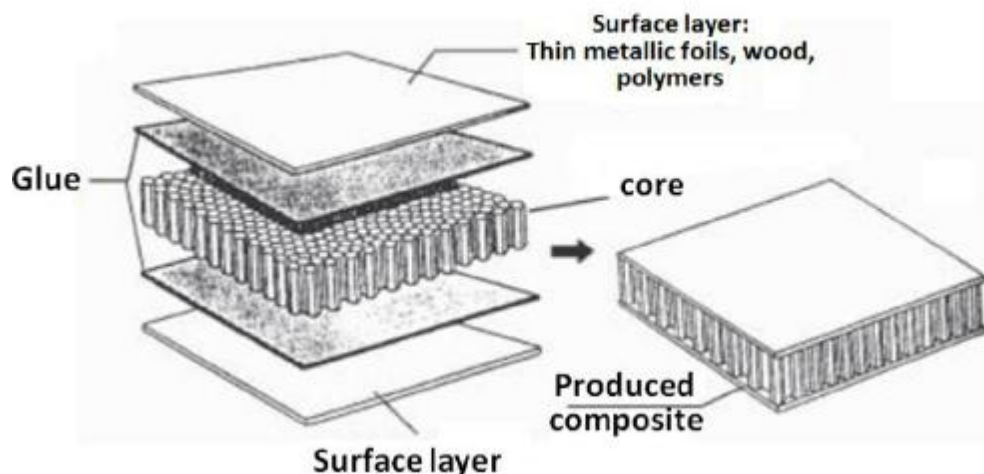


Figura 10: Compost amb nucli de bresca

d) Teoria 2: La cel·lulosa bacteriana

D.1.- Què és la cel·lulosa?

La cel·lulosa és el principal component estructural que forma i sustenta les parets dels teixits cel·lulars dels vegetals.

Des del punt de vista químic, la cel·lulosa, $(C_6H_{10}O_5)_n$ amb un valor de n entre 10000 i 15000, és un polímer natural constituït per una llarga cadena de carbohidrats units covalentment. En la Figura 11 es mostra l'estructura molecular de la cel·lulosa [10] [11].

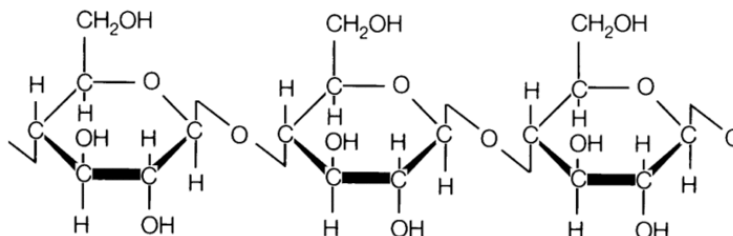


Figura 11: Molècula de cel·lulosa

Els polisacàrids són molècules formades per molts monosacàrids. Hi ha dos tipus principals de polisacàrids; el primer comprèn molècules formades per monosacàrids

iguals, els homopolisacàrids, els quals s'utilitzen bàsicament com a reserva dels éssers vius per realitzar funcions en condicions en les quals no és possible obtenir sucre, o bé com a component estructural, com és el cas de la cel·lulosa. El segon grup de polisacàrids està format pels anomenats heteropolisacàrids, que són polímers de monosacàrids de diferents tipus. Aquests compostos tenen unes funcions més variades que els homopolisacàrids [10] [12].

La cel·lulosa, doncs, és un polímer lineal de la glucosa que representa probablement el polisacàrid més abundant en la naturalesa. Aquest polisacàrid es troba en els llegums i altres aliments presents en la dieta humana tot i no ser digerible ni aprofitable per l'home ni animals superiors (excepte els rumiants, que l'aprofiten parcialment degut a algunes bactèries del seu aparell digestiu), però la seva presència té una gran importància per afavorir el funcionament de l'intestí [12].

Les molècules unitàries de glucosa en la cel·lulosa s'uneixen una amb l'altra entre els àtoms de carboni 1 i 4 de cada una d'elles mitjançant enllaços tipus beta(β -1,4-glucosídic)[12], fet que provoca que la cel·lulosa sigui insoluble en aigua. En aquesta llarga cadena de glucoses s'estableixen ponts d'hidrogen entre els grups hidroxil originant estructures cristal·lines. Aquestes estructures formen el que s'anomena una micel·la, que inclou de 60 a 70 cadenes moleculars. Cada 20 micel·les es forma una microfibril·la, i cada 250 microfibril·les es forma una fibril·la. La fibra compacta final comprèn fins a 1500 fibril·les i és de gran rigidesa. En la Figura 12 es pot observar un esquema del pas de molècules a fibres[10][13] [14].

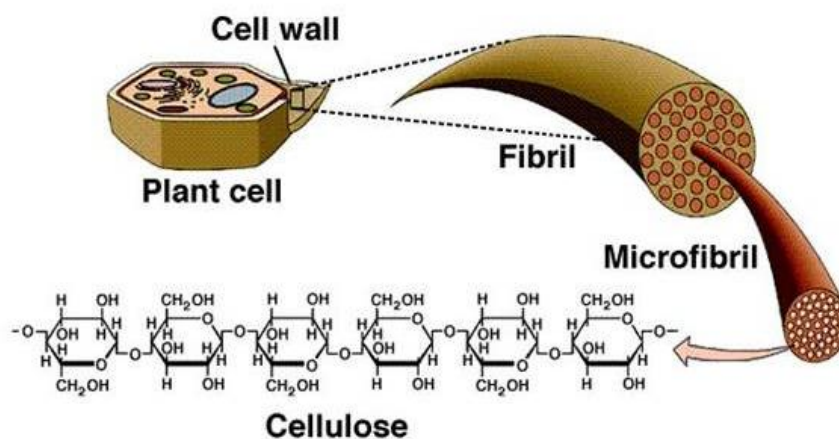


Figura 12: Esquema de la fibra de cel·lulosa

Pel que fa al pes molecular de la cel·lulosa, aquest depèn de l'origen que tingui (fusta, cotó, etc.), del mètode d'aïllament d'aquesta i del mètode de determinació del pes molecular utilitzat. El que és clar és que la cel·lulosa nativa té un alt grau de polimerització major de 10000 i un pes molecular mitjà de 2000000 [15].

D.2.- Tipus de cel·lulosa

El polimorfisme o al·lotropia és l'existència de més d'una forma cristal·lina, diferint en les propietats físiques i químiques com ara la solubilitat, la densitat, el punt de fusió, la forma del cristall o les propietats òptiques o elèctriques. En el cas de la cel·lulosa existeixen quatre polimorfismes diferents [16].

Les microfibril·les de cel·lulosa mencionades anteriorment es componen de dues regions diferents. La regió cristal·lina està formada per molècules altament endreçades, mentre que les molècules en la regió amorfa o para-cristal·lina no ho estan tant [16].

El grau de cristal·linitat de la cel·lulosa (entès com la proporció relativa de les regions cristal·lines) varia en funció del tipus de cel·lulosa. D'aquesta manera la cel·lulosa té 4 formes al·lotròpiques que inclouen la cel·lulosa I, II, III₁, III₁₁, IV₁, i IV₁₁ [16].

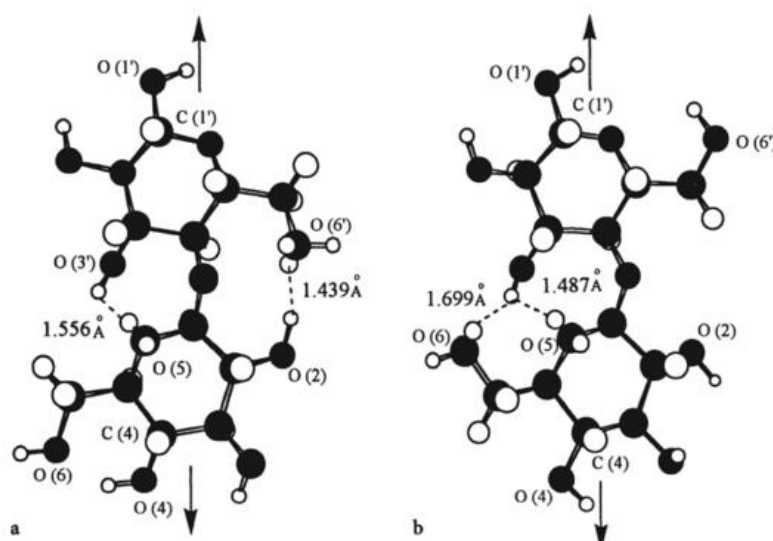


Figura 11: Esquema de la cel·lulosa I (esquerra) versus la cel·lulosa II (dreta)

La cel·lulosa I es troba a la naturalesa i és coneguda comunament com a cel·lulosa nativa. Presenta dos tipus d'estructura cristal·lina; I_α i I_β, les quals poden coexistir en diferents proporcions depenent de l'origen. La cel·lulosa I_α és produïda en major proporció per bacteries i algues mentre que la I_β, és la que predomina en les plantes (fusta, cotó, etc.). Ambdues es diferencien en l'empaquetament cristal·lí, la conformació molecular i els enllaços d'hidrogen. La cel·lulosa I es pot convertir en altres formes polimòrfiques mitjançant diferents tractaments. John Mercer, un científic anglès, va descobrir l'any 1844 una manera de convertir cel·lulosa I en cel·lulosa II la qual s'anomena mercerització [15] [16].

La cel·lulosa II és l'estructura més estable de rellevància tècnica. Pot ser obtinguda a partir de cel·lulosa I ja sigui mitjançant el tractament amb hidròxid de sodi concentrat (procés de mercerització) o mitjançant solubilització seguida de precipitació i regeneració alterant-se l'estructura original de la cel·lulosa I. De forma natural també és obtinguda a partir de la bactèria *Gluconacetobacter Xylinum*, i per algues de l'espècie *Halicystis*. La diferència entre la cel·lulosa I i la cel·lulosa II es basa en les dimensions de la cel·la unitària i la polaritat de les cadenes. En la Figura 13 es poden veure els dos tipus de cel·lulosa, observant que varien les posicions dels ponts d'hidrogen (línies discontinües) i dels angles d'enllaç.

A partir de la cel·lulosa II podem obtenir la cel·lulosa III amb una reacció reversible en la que hi intervén aigua bullint i àcid clorhídric [15] [16].

Les formes de cel·lulosa III_I i III_{II} són, doncs, obtingudes a partir de cel·lulosa I i II, mentre que els tipus de cel·lulosa IV_I i IV_{II} poden ser obtingudes mitjançant l'escalfament en glicerol de les cel·luloses III_I i III_{II}, respectivament [15] [16].

En la Figura 14 es recullen totes les reaccions conegudes per passar d'una forma polimòrfica a una altra.

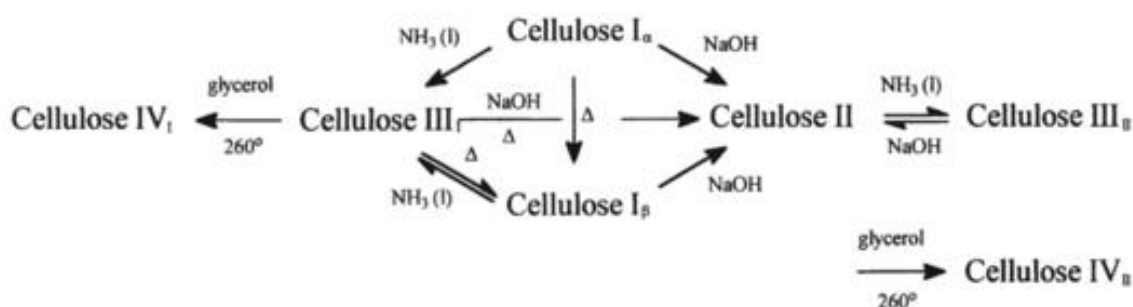


Figura 12: Diferents transformacions dels polimorfismes de la cel·lulosa

Des del punt de vista mecànic, els mòduls elàstics de les diferents formes al·lotròpiques s'ha demostrat que són totalment diferents. En la Taula 2 es mostra el mòdul elàstic en GPa de cada polimorfisme. Així doncs, efectivament les propietats mecàniques de cada tipus de cel·lulosa varien, cosa que farà que cada una sigui útil per a unes determinades aplicacions.

Polimorfisme	Cel·lulosa I	Cel·lulosa II	Cel·lulosa III _I	Cel·lulosa III _{II}	Cel·lulosa IV _I
Mòdul elàstic [GPa]	138	88	87	58	75

Taula 2: Mòdul elàstic de cada polimorfisme de la cel·lulosa

D.3.- La cel·lulosa bacteriana; caracterització i propietats

Un dels primers treballs sobre la producció de cel·lulosa bacteriana data del 1953 i el van realitzar Scharmm i Hestrin, fent servir *Acetobacter Xylinum* en cultiu estàtic. En l'estudi van descobrir que la producció de cel·lulosa era funció del subministrament d'oxigen tant en cultiu estàtic com en cultiu agitat. Els autors van desenvolupar un medi que constava de glucosa (20 g/L), peptona de caseïna (5 g/L), extracte de llevat (5 g/L), fosfat de sodi dibàsic anhidre (2,7 g/L) i àcid cítric (1,15 g/L) a pH 6. Aquest medi és un dels més utilitzats actualment per a la producció de cel·lulosa bacteriana [17].

L'any 1959, Dudman va presentar un estudi en el que avaluava l'efecte de les condicions del medi de cultiu per la síntesi de cel·lulosa utilitzant *Acetobacter Acetogenum*, i va descobrir que l'ús de glicerol com a font de carboni augmentava un 40% la producció comparant-ho amb la fructosa. [5]

Fins a l'actualitat s'han fet diversos estudis sobre la producció de la BC on la font de carboni era variant, però pel que fa a la font de nitrogen l'extracte de llevat és la font més utilitzada per al creixement de la bactèria [18].

La cel·lulosa bacteriana, doncs, s'obté de les bactèries pertanyents als gèneres *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Sarcina*, *Achromobacteri* *Zooglea*. L'espècie amb més capacitat productiva és el *Gluconacetobacter Xylinum* (també dit *Acetobacter Xylinum*) [19].

Les microfibril·les de la BC tenen dues característiques particulars; la polaritat d'aquestes és unidireccional i són de gruix variable. El mecanisme de cristal·lització del *Gluconacetibacter Xylinum* pot donar origen a dues formes al·lotròpiques de la cel·lulosa abans esmentades; si les microfibril·les s'orienten en forma paral·lela, es sintetitza cel·lulosa del tipus I, mentre que si les microfibril·les s'orienten de manera antiparal·lela s'obté cel·lulosa tipus II. En Figura 15 es mostren fibres de cel·lulosa bacteriana i de cel·lulosa vegetal, tal i com es pot observar, l'estructura és diferent [19].

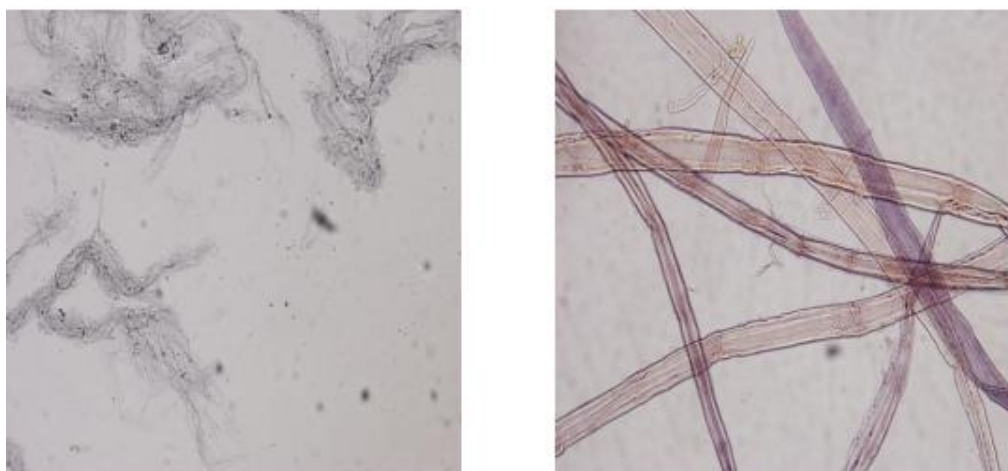


Figura 15: A l'esquerra, fibres de BC. A la dreta, fibres de cel·lulosa vegetal

La microestructura de la cel·lulosa bacteriana està conformada per microfibril·les amb un diàmetre de 4 a 7 nm i un grau de polimerització de 2000 fins a 14000 molècules de glucosa. Les microfibril·les es cristal·litzen en paquets que arriben a un gruix de 1 a 9 μm i formen una estructura reticulada mitjançant ponts d'hidrogen. La condensació d'aquests paquets o cintes dóna lloc a la macroestructura de la CB, que depèn totalment de les condicions de cultiu. En cultiu estàtic, es genera una pel·lícula en la interfase aire-líquid del medi de cultiu on les cintes es solapen formant plans paral·lels (Figura 16). En cultiu agitat s'aconsegueix un menor grau d'agrupament i la quantitat de plans paral·lels és menor, cosa que fa que es formin uns grànuls irregulars de cadenes fibroses (Figura 17) [19].



Figura 16: Cultiu estàtic

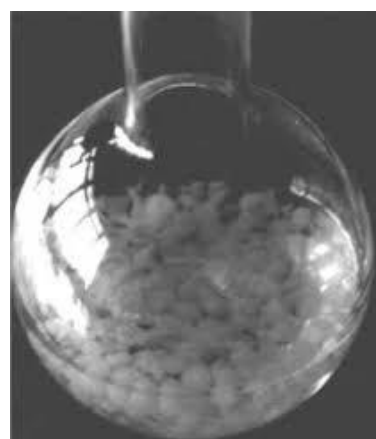


Figura 13: Cultiu agitat

En general la cel·lulosa bacteriana és estable en solucions bàsiques, però en condicions dràstiques (NaOH 1M, 170°C) pot hidrolitzar-se. Les seves propietats es poden veure alterades per diferents agents oxidants al trencar-ne les cadenes i alterar-ne la temperatura. El mecanisme de síntesis de la cel·lulosa bacteriana li confereix una puresa superior a la que es pot obtenir de qualsevol font vegetal, fet que fa que tingui unes propietats úniques comparada amb la seva homòloga; un alt grau de cristal·lització, una alta resistència a la pressió, i una gran elasticitat i durabilitat. També té una alta capacitat d'absorció d'aigua degut a un menor diàmetre de les microfibril·les que implica major superfície que en la cel·lulosa vegetal. A més, la CB és inerta metabòlicament, no és tòxica, i no provoca al·lèrgies de contacte, fet que la fa idònia per aplicacions mèdiques [20] [21].

Un cop produïda, la cel·lulosa bacteriana es presenta en forma d'un hidrogel (veure Figura 18). Aquest hidrogel de cel·lulosa consta d'un 0,9% de cel·lulosa bacteriana, i d'un 99,1% d'aigua. D'aquest gran volum d'aigua, un 0,3% és aigua lligada, mentre que un 98,8% és aigua lliure.



Figura 18: Hidrogel de BC

L'aigua lliure pot ser eliminada molt fàcilment mitjançant diverses formes de deshidratació, mentre que l'aigua lligada queda retinguda i unida a les fibres de cel·lulosa mitjançant adsorció i formant uns capil·lars d'entre 0,5 i 1 micròmetre. En observar amb un microscopi les fibres del gel hidratat, s'observa que tenen unes dimensions de 50nm. Les tècniques de deshidratació de l'hidrogel més utilitzades són la liofilització, l'assecat i el premsat en calent [22].

Degut a la seva estructura cristal·lina, la cel·lulosa bacteriana té unes excel·lents propietats mecàniques, les quals la converteixen, com ja s'ha comentat anteriorment, en un material ideal per al reforç de materials compostos. Les propietats mecàniques de la BC s'estudien principalment a partir de làmines seques d'aquesta. El mòdul d'elasticitat de les làmines pot variar entre 16 i 18 GPa en funció del mètode d'assecat (aire o premsat en calent). L'esforç a tracció de les làmines arriba als 260 MPa i la deformació fins a un 2,1% respectivament, tot i que depèn del mètode de neteja utilitzat un cop retirada la BC del medi de cultiu [22].

En el cas de l'anàlisi de gels de cel·lulosa bacteriana sense assecat, el mòdul d'elasticitat varia entre 8 i 12 MPa, i l'esforç de tracció entre 15 i 20 MPa [15].

En la Taula 3 es pot observar les propietats mecàniques de la cel·lulosa bacteriana en comparació amb altres polímers.

Material	Mòdul [GPa]	d'elasticitat	Esforç a la tracció [MPa]	Elongació [%]
Cel·lulosa Bacteriana	15-35		200-300	1,5-2,1
Polipropilè (PP)	1-1,5		30-40	100-600
Tereftalat (PET)	3-4		50-70	50-300
Cel·lofana	2-3		20-100	14-40

Taula 3: Propietats mecàniques de la cel·lulosa bacteriana i altres materials orgànics

Pel que fa a la solubilitat, depèn de diferents factors; estructura, pes molecular i origen entre d'altres. Tot i així, la cel·lulosa bacteriana arriba a dissoldre's utilitzant una solució de 8,5% de NaOH, i la solubilitat s'incrementa mitjançant l'addició d'un 1% d'urea [23].

Pel que fa a la degradació tèrmica de la BC en estat pur i sense tractar (en forma d'hidrogel), s'inicia entre 290 i 298°C. La seva temperatura de fusió és de 120,4°C i la seva temperatura de transició vítria (Tg) és de 13,9°C. Cal remarcar que quan es realitzen tractaments alcalins als gels, s'obté una Tg entre 41,4°C i 48,8°C i s'incrementen els valors de la temperatura de descomposició tèrmica, arribant fins a 343,2°C i 370,0°C [15].

Arribats a aquest punt, és interessant comparar les propietats de la cel·lulosa bacteriana amb les de la cel·lulosa vegetal, per justificar encara més el creixent interès d'aquest material.

En la Figura 19 es mostra un espectre d'IR de la cel·lulosa bacteriana i de la cel·lulosa vegetal. En aquest espectre es pot observar que la composició d'ambdues fibres és molt similar. La diferència prou significativa d'alguns pics d'absorció es deriva del lignit residual en les fibres vegetals i de l'aigua absorbida per les mostres de cel·lulosa bacteriana.

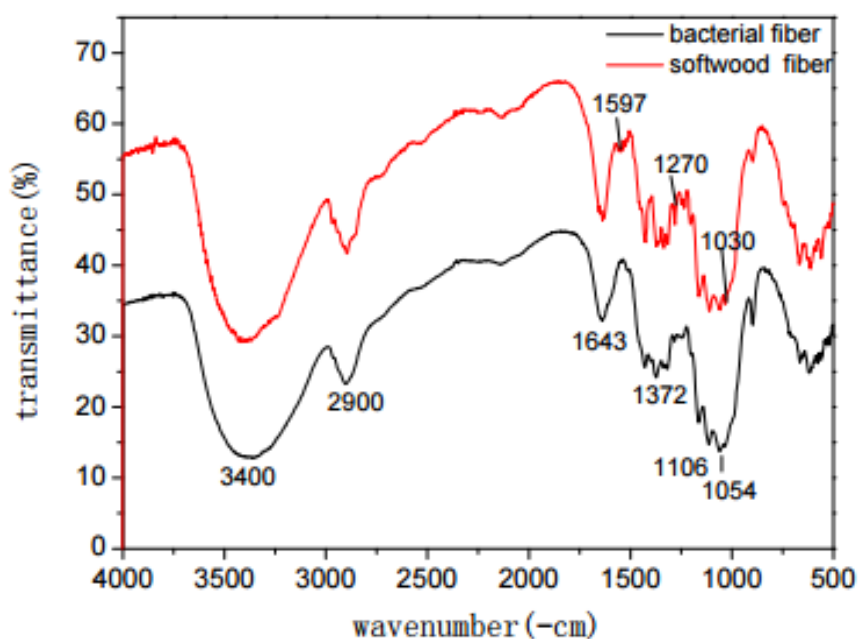


Figura 19: Espectre d'IR de la cel·lulosa bacteriana i la cel·lulosa vegetal

L'índex de cristallinitat obtingut per aquest espectre va mostrar que el de la cel·lulosa bacteriana era lleugerament major al de la cel·lulosa vegetal.

D'aquí se'n pot concloure, doncs, que les propietats especials de les fibres de cel·lulosa bacteriana es deuen a la macroestructura reticulada d'aquestes i no pas a l'estructura molecular [24].

Pel que fa a la llargada de les fibres, tal i com es mostra a la Taula 4 les fibres bacterianes resulten ser més curtes que les fibres vegetals. El mateix passa amb l'amplada d'aquestes.

	Llargada (mm)	Amplada (μm)
Fibres bacterianes	0,69	19,87
Fibres vegetals	1,05	31,64

Taula 4: Llargada i amplada de fibres bacterianes vs. fibres vegetals

Si comparem les propietats mecàniques de la cel·lulosa bacteriana amb la cel·lulosa obtinguda de les fibres de cotó (Taula 5), podem observar que el mòdul d'elasticitat de la cel·lulosa bacteriana arriba a ser considerablement superior al de la cel·lulosa vegetal. En el cas de l'esforç a tracció ambdós valors es troben en un rang semblant, tot i que la cel·lulosa vegetal obtinguda del cotó arriba a uns valors més elevats (els números varien lleugerament -però es mantenen de l'ordre de la centena- si es tracte d'una cel·lulosa vegetal d'un altre tipus).

Material	Mòdul [GPa]	d'elasticitat	Esforç a la tracció [MPa]	Elongació [%]
Cel·lulosa Bacteriana	15-35		200-300	1,5-2,1
Cel·lulosa vegetal	4,98-10,92		264-654	3,0-7,0

Taula 5: Comparació de les propietats mecàniques d'una cel·lulosa bacteriana vs. una cel·lulosa vegetal

En resum, la cel·lulosa bacteriana és un material renovable, natural, amb unes propietats mecàniques superiors a la cel·lulosa vegetal, amb una gran porositat i capacitat d'absorció d'aigua a més de ser biodegradable i tenir una gran biocompatibilitat (útil per aplicacions mèdiques).

D.4.- Aplicacions de la cel·lulosa bacteriana

La cel·lulosa bacteriana és un nanomaterial respectuós amb el medi ambient amb el qual es poden preparar composts de gran valor afegit. Les bones propietats mecàniques, antibacterianes, òptiques, elèctriques, magnètiques, catalítiques i biomèdiques el fan ser un material amb un gran potencial per a obtenir un gran ventall d'aplicacions. A més, la

puresa cristal·lina de la BC té aplicacions en camps que la cel·lulosa vegetal no pot abastar [25].

En el camp dels materials compostos, les fibres naturals estan guanyant terreny i substituint cada vegada més les fibres manufacturades, amb l'avantatge de ser menys denses, menys costoses i biodegradables però amb l'inconvenient de tenir menys compatibilitat entre la fibra i la matriu [26]. No obstant, aplicant certes modificacions estratègiques es poden obtenir nanocompòsits funcionals. Una simple modificació biosintètica o química en la superfície de la cel·lulosa bacteriana pot millorar la seva compatibilitat amb diferents matrius [27].

Els abundants grups funcionals hidroxil actius permeten la combinació amb diferents nanoestructures inorgàniques i polimèriques. En el cas dels compòsits reforçats amb fibres, les matrius més utilitzades són de HPDE, LPDE, PP o PEEK [26].

Les estratègies de construcció de nanomaterials compostos basats en cel·lulosa bacteriana han estat molt estudiades al llarg dels últims anys. El condicionament de les fibres bacterianes es pot dur a terme mitjançant una modificació biosintètica, modificant químicament la superfície de la cel·lulosa o afegint-hi partícules a posteriori aconseguint crear compòsits in situ o ex situ [27].

La modificació biosintètica consisteix la manipulació de la biogènesi de la BC canviant-ne les condicions de cultiu per controlar-ne la composició, l'estructura o les propietats. Afegint certs additius o partícules als nutrients durant la biosíntesi influeix en la microestructura, polimorfisme i la mida del cristall entre d'altres. D'aquesta manera la BC arriba a ser compatible per a generar compòsits in situ [27].

Tot i que la modificació biosintètica de la cel·lulosa bacteriana és una tecnologia sostenible, l'estricta entorn de fermentació microbiana restringeix en alguns casos la introducció d'alguns additius. Mitjançant la introducció de nous grups funcionals a l'estructura de la BC es pot canviar la propietat hidròfila, la capacitat d'absorció d'ions i les propietats òptiques i mecàniques. Un bon exemple de la modificació química de la BC és l'acetilació que es duu a terme per a que aquesta sigui compatible en diferents matrius [27].

Un cop la cel·lulosa és compatible per a fer nanocompòsits, aquests es poden fer in situ mitjançant reaccions de precipitació o reducció. La porositat de l'estructura de la BC facilita la penetració de diferents ions metàl·lics produint materials polimèrics conductors, metàl·lics o semiconductors [27]. En la Figura 20 es mostra un diagrama de l'esquema d'una preparació in situ d'un nanocompòsit de partícules.

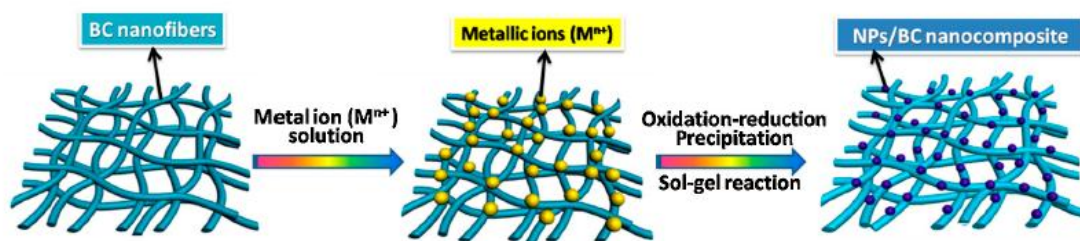


Figura 20: Esquema d'una preparació in situ d'un nanocompòsit

La introducció de components o partícules ex situ s'acostuma a fer per la impregnació de solucions. Un bon exemple és la immersió de l'hidrogel en partícules de sílice. Aquesta sílice queda fixada entre les fibres de la matriu d'hidrogel augmentant la resistència respecte l'hidrogel original [27].

Tots aquests nanocompòsits obtinguts per aquests mètodes tenen aplicacions que van des de la medicina, l'electrònica, la indústria alimentària i la tecnologia entre d'altres.

En el camp de la medicina, l'elevada força mecànica de la pel·lícula de BC en estat hidratat, la seva permeabilitat a líquids i gasos i la poca irritació dèrmica al contacte confereixen unes propietats òptimes com a substitut temporal de la pell en teràpia de cremades, ferides, úlceres i abrasions de l'epidermis [17] [28]. El compòsit utilitzat inclou nanopartícules de plata que protegeixen les ferides dels microorganismes tant gram-negatius com gram-positius. Un estudi fet l'any 2012 va descobrir que la cel·lulosa obtinguda per maltosa i amb un contingut de l'1,06% de nanopartícules de plata tenia el millor efecte antimicrobià pel microorganisme *E. Coli* [28].

La BC també s'ha estudiat com a possible component d'implants vasculars per microcirurgia gràcies al disseny d'un reactor que permet obtenir-la en forma tubular [28].

Per altra banda també s'han creat compòsits amb hidroxiapatita per reemplaçar el teixit ossi i amb alcohol polivinílic per a implants de còrnia [28].

En odontologia i veterinària també s'ha estudiat l'ús de la cel·lulosa bacteriana com a components d'implants dentals i com a apòsit per úlceres en cavalls [17].

Dins de la indústria alimentària, les fibres bacterianes s'utilitzen com a espessidor, estabilitzant, gelificant, massificant i per a fer les populars postres filipines de "nata de coco", basades en la fermentació en un cultiu de suc de fruita [13].

En la indústria farmacèutica s'ha estudiat el recobriment amb cel·lulosa de taletes de paracetamol ja que aquesta retarda l'alliberament del fàrmac [13].

En el camp de la tecnologia, les membranes de BC s'han utilitzat per crear diafragmes d'alta fidelitat acústica gràcies a l'alta capacitat sònica, propietat comparable a les pel·lícules d'alumini o titani [28]. Aquestes membranes també tenen una alta conductivitat elèctrica i se'n fan dispositius emissors de llum incorporant alguns metalls a l'estructura

de la cel·lulosa. A més, les membranes també s'utilitzen per la permeabilitat de gasos, tot i que el flux de permeat en la majoria de processos de separació és bastant baix [28]. En la Figura 21 es mostra una membrana de cel·lulosa bacteriana.

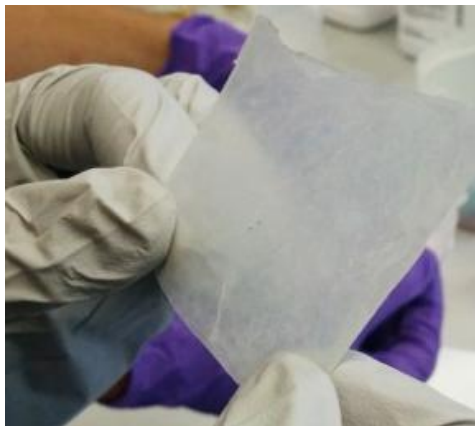


Figura 21: Membrana de cel·lulosa bacteriana

També s'ha observat que es pot utilitzar com a suport en el cultiu de cèl·lules de mamífers com a substrat pel cultiu de teixits [28].

Per últim, la cel·lulosa bacteriana també ha revolucionat el camp dels sensors. La gran superfície, l'elevat nombre de grups hidroxil i la gran capacitat d'absorció i retenció d'aigua fan la BC un material ideal per a sensors de gas i sensors sensibles a la humitat [27]. Per altra banda, la BC també s'utilitza com a recobriment per a sensors de glucosa pels diabètics [28].

La BC també és útil dins del camp de la refinaria per a absorció de toxines i olis, en la indústria tèxtil com a material d'alta absorció aquosa i roba esportiva o en cosmètica com a estabilitzador d'emulsions, condicionador i cremes [28].

e) Teoria 3: obtenció de cel·lulosa bacteriana

La producció de cel·lulosa bacteriana la duen a terme diverses bactèries, però l'espècie amb més capacitat productora és el *Gluconacetobacter Xylinus* (veure Figura 22). És per això que aquest microorganisme ha servit de model en l'estudi de la biosíntesi de la cel·lulosa bacteriana. El seu hàbitat natural són fruites i vegetals en procés de descomposició, és un bacteri aerobi i realitza l'oxidació incompleta de diferents sucres i alcohols (fermentació oxidativa de substàncies com la glucosa, sacarosa, glicerol, mannitol o arabitol) produint cel·lulosa bacteriana sobre medis líquids i sòlids formant una pel·lícula sobre la superfície [28].

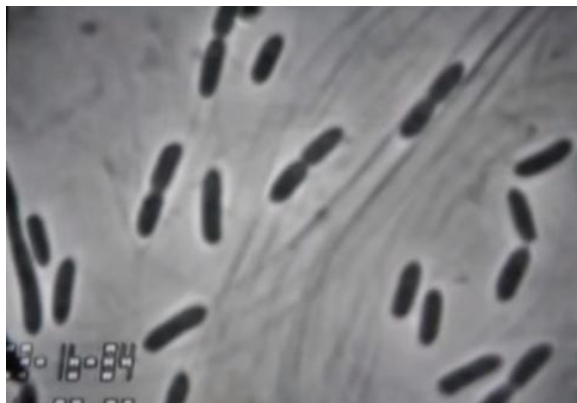


Figura 22: Biosíntesi de la cel·lulosa pel *Gluconacetobacter*

Aquesta pel·lícula realitza una funció fisiològica en el *Gluconacetobacter xylinus* i en les altres bacteries que la produeixen; confereix una protecció mecànica, química i biològica [28]. És una barrera física que protegeix la bactèria de la radiació ultraviolada, augmenta la capacitat de colonitzar substrats i el seu caràcter higroscòpic li permet retenir la humitat preveient l'asseccament del substrat [28]. A més, la matriu polimèrica facilita el subministrament de nutrients a la cèl·lula ja que aquests es concentren millor degut a les propietats d'adsorció de l'estructura de la cel·lulosa [28]. La pel·lícula de BC també permet al microorganisme estar en la interfase aire/líquid, obtenint amb més facilitat l'oxigen dissolt necessari pel seu creixement [28].

E.1.- Precedents històrics

Tot i que la formació de cel·lulosa bacteriana va ser descoberta per primera vegada per J. Brown, no va ser fins a la segona meitat del segle XX que va ser objecte d'atenció.

Schram i Hestrin l'any 1954 varen realitzar un dels primers treballs de producció de cel·lulosa bacteriana fent servir *Gluconacetobacter xylinus* en cultiu estàtic. En aquest estudi van observar que la producció de cel·lulosa era funció del subministrament d'oxigen tant per al cultiu estàtic com per al cultiu agitat i que la producció òptima s'aconseguia utilitzant aire enriquit [28].

Hestrin i Schramm van desenvolupar un medi compost per glucosa (2% p/v), peptona (0,5%), extracte de llevat (0,5%), fosfat disòdic (0,27%) i àcid cítric (0,115%) a pH 6. Aquest medi actualment es coneix com H-S i és dels més utilitzats en estudis de producció de cel·lulosa bacteriana [28].

Posteriorment Dudman, l'any 1959 va presentar un estudi de l'efecte de les condicions de cultiu sobre la producció de cel·lulosa bacteriana amb *Acetobacter xylinus* i va descobrir que l'ús de glicerol com a font de carboni augmentava la producció de cel·lulosa en un 40% comparat amb la glucosa i fructosa. Pel que fa a les fonts de carboni complexes,

l'autor mostra com a l'utilitzar melassa hidrolitzada s'obté una producció de fins al 88% superior a es trobades en medis de glucosa com a font de carboni [28].

L'augment de la producció s'atribueix a que l'ús de glucosa com a única font de carboni promou la producció per part dels microorganismes d'àcid cetoglucònic, que no només disminueix la quantitat de glucosa disponible per polimeritzar, sinó que condueix a nivells de pH que afecten a la viabilitat cel·lular [28].

Aquests dos estudis van ser els primers en preguntar-se com es produïa la cel·lulosa bacteriana. A partir d'aquí, molts estudis posteriors s'han entrat en determinar la influència en el medi de cultiu de les diferents fonts de carboni i nitrogen, pH i temperatura.

E.2.- Influència de les fonts de carboni

Des de que Schramm i Hestrin van publicar els seus estudis sobre la producció de cel·lulosa bacteriana, el medi de cultiu més utilitzat és el que consta de glucosa com a font de carboni. No obstant, molts estudis posteriors han buscat noves fonts per substituir-la amb la finalitat d'abaratir costos per a fer rendible una producció a nivell industrial. A més, diversos estudis han demostrat que substrats diferents de la glucosa augmenten la producció de cel·lulosa comparativament, cosa que s'atribueix al fet que la glucosa com a única font de carboni promou la producció per part dels microorganismes d'àcid glucònic, que no només disminueix la quantitat de glucosa disponible per polimeritzar, sinó que condueix a nivells de pH que afecten a la viabilitat cel·lular [28].

La taula 6 mostra els resultats d'un estudi on es comparen diferents fonts de carboni amb el rendiment de producció de cel·lulosa obtingut. Tal i com es pot observar, l'arabitol i el manitol són les dues úniques fonts estudiades que obtenen un rendiment superior a la glucosa.

Font de carboni	Rendiment
Glucosa	100
Fructosa	92
Galactosa	15
Mannosa	3
Xilosa	11
Arabinosa	14
Sorbosa	11

Lactosa	16
Maltosa	7
Sucrosa	33
Cel·lobiosa	7-11
Midó	18
Etanol	4
Etilenglicol	1
Dietilenglicol	1
Propilenglicol	8
Glicerol	93
Arabitol	620
Mannitol	380
Citrat	20
Cap font de carboni	2

Taula 6: Comparació dels diferents fonts de carboni en funció del rendiment de producció obtingut

Tots els substrats definits a continuació s'han provat amb *Acetobacter Xylinus*, ja que, com s'ha comentat anteriorment, és l'espècie amb més capacitat productora.

Diferents monosacàrids, polisacàrids, alcohols, àcids orgànics i altres components van ser analitzats l'any 1998 per Jonas i Farah, els quals van descobrir que les fonts de carboni que proporcionaven més productivitat eren l'arabitol i el mannitol, obtenint-se una producció de fins a 6,2 i 3,8 vegades superior en comparació amb la glucosa [18]. Aquests dos alcohols no produeixen cap tipus d'àcid glucònic durant la fermentació, i per tant el pH es manté estable durant el temps de cultiu [25].

L'any 2006, Keshk i col·laboradors van utilitzar melassa de remolatxa com a font de carboni. Els resultats van demostrar que la producció s'havia incrementat un 31% respecte la glucosa, cosa que van atribuir a la quantitat de nutrients addicionals presents en la melassa, especialment els sulfurs i el nitrogen orgànic, que afavoreixen el creixement dels microorganismes [28].

Per altra banda, Bae i Soda van investigar l'ús de la melassa prèviament tractada amb àcid sulfúric com a font de carboni observant un augment de la producció d'un 76%

respecte a la melassa sense tractar. Això es deu a que la melassa no tractada provoca que el microorganisme produeixi altres polisacàrids que disminueixen la producció de cel·lulosa [28].

Alguns estudis també han demostrat que utilitzant concentracions de glucosa més baixes, la producció de cel·lulosa pot arribar a augmentar fins 0,6 g/g de glucosa/dia després de 2 a 4 dies de cultiu. En la majoria d'estudis publicats, la productivitat de la cel·lulosa utilitzant glucosa o fructosa és menor i oscil·la entre 0,02 g/g de cel·lulosa/dia i 0,07 g/g de cel·lulosa/dia. Aquests valors tant baixos es poden donar a causa del temps de fermentació, que en la majoria de casos és de 4 a 10 dies o a la concentració de la font de carboni. No obstant, hi ha altres paràmetres a tenir en compte com ara la relació superfície/volum o l'àrea superficial relativa del sistema de fermentació [25].

A part de les fonts de carboni esmentades (glucosa, mannitol, arabitol i melassa), també s'utilitzen la sacarosa, la fructosa, la lactosa i fins i tot s'ha demostrat la capacitat de la bactèria per sintetitzar l'àcid làctic o l'àcid succínic [28].

Hung i Qiu, l'any 2008 van utilitzar farina de konjac hidrolitzada amb hidròxid de calci com a font de carboni i la producció de cel·lulosa va resultar ser fins a 3 vegades major que la de la glucosa. L'augment de la producció es va atribuir tant a la hidròlisi de la farina com a la presència de l'ió Ca^{++} en el medi de cultiu, que afavoreix l'acció de la cel·lulosa sintasa i per tant la producció de cel·lulosa [28].

L'any 2009, Kurosumi compara l'ús de diferents sucres de fruita en un medi H-S amb glucosa i sacarosa com a font de carboni, i els sucres de fruita sense cap component addicional, només ajustant el pH inicial. La major producció es va donar en el primer cas, ja que les fonts de nitrogen del medi H-S i els compostos addicionals de les fruites afavoreixen el creixement dels microorganismes [28].

L'any 2010, Jung i col·laboradors van realitzar un procés amb glicerol com a font de carboni en cultiu agitat i van descobrir que la producció de cel·lulosa resultava ser un 91% major en comparació amb la glucosa, resultat similar a l'obtingut per Dudman en cultiu estàtic. A més, es reduïa la producció d'àcid glicèric [28].

Un altre compost estimulador de la síntesi de cel·lulosa ha resultat ser l'etanol. L'etanol es considera una font addicional de carboni, ja que contribueix a la generació de trifosfat d'adenosina, i d'aquesta manera es millora la productivitat de la cel·lulosa. A més, també contribueix a l'eliminació espontània de les bactèries no productores de cel·lulosa. Tot i així, es considera que no és un substrat de la síntesi de cel·lulosa, sinó una font d'energia addicional [13] [18].

Altres medis de cultiu econòmics i aptes per a la producció a gran escala són les restes d'agricultura. Alguns estudis han demostrat que, per exemple, les restes de cervesa, les pells de raïm o de pinya, etc. Són unes fonts de carboni beneficioses per a la producció de cel·lulosa bacteriana. Aquestes fonts de carboni, que per algunes indústries són un residu, generen un impacte ambiental positiu [29].

E.3.- Influència de les fonts de nitrogen

La base de la majoria de treballs d'investigació és el medi de cultiu H-S. Aquest conté com a font de nitrogen extracte de llevat i peptona en un percentatge del 0,5 de cada.

No obstant, diferents grups de recerca han alterat aquests percentatges i han buscat fonts de nitrogen alternatives per obtenir un millor rendiment en la producció de cel·lulosa bacteriana. Diferents estudis han afirmat que el xarop de blat de moro o CSL (de l'anglès corn syrup liquor), que és un subproducte derivat de la molta de blat de moro, és una font molt més efectiva que la del medi H-S sobretot en cultius agitats [25].

S'han provat altres fonts de nitrogen com ara la polipeptona, triptona, el sulfat d'amoni, la caseïna i el glutamat sòdic, però cap d'aquestes ha donat els resultats del CSL [28] [13].

E.4.- Influència del pH, la temperatura i altres aspectes

El rang òptim de pH per a la producció de cel·lulosa amb *Gluconacetobacter Xylinus* és d'entre 4 a 7 [25]. A mesura que transcorre el temps de cultiu, el pH del medi disminueix degut a la transformació dels carbohidrats en àcids acètics i de la glucosa en àcids glucònics [13]. És per això que molt autors utilitzen pH 5 o 6 per les seves investigacions, tot i que s'ha demostrat que per a la producció industrial un pH d'entre 4 i 4,5 dóna millors resultats sobretot per evitar contaminacions [25]. Amb freqüència es sol afegir fosfat de sodi o potassi per amortir els canvis de pH [28].

Pel que fa a la temperatura, és conegut que la temperatura òptima per a la producció és de 25 a 30°C [25].

Per altra banda, s'han descobert altres components que augmenten la productivitat de la cel·lulosa bacteriana. Un d'aquests és el lactat, que augmenta la producció fins a un 22% i sovint s'utilitza en cultius agitats [28].

Wantanabe i Yamanaka van demostrar que les tensions d'oxigen afecten directament a la producció de cel·lulosa. Segons els seus estudis, tensions d'oxigen des del 10% fins al 25% augmenten la producció de cel·lulosa [25].

Un altre factor a tenir en compte és l'addició de polisacàrids al medi de cultiu. Aquesta condueix a una disminució dels esforços tallants dins del reactor i es redueix el risc de mutació de les cèl·lules productores de cel·lulosa a cèl·lules no productores [25].

La producció de cel·lulosa també depèn de la relació superfície/volum; un alt rati de s/v de 2,2cm⁻¹ dóna millors resultats. La producció depèn de l'àrea superficial [25].

Per altra banda, Matsuoka va demostrar que la metionina tenia un efecte important en el creixement de la cèl·lula i la producció de cel·lulosa augmentava un 90%.

També s'ha descobert que certes vitamines com l'àcid nicotínic, l'àcid p-aminobenzoic i la piridoxina tenen un paper important en el creixement cel·lular [25].

E.5.- Cultiu estàtic i cultiu agitat

Les tècniques de fermentació utilitzades per produir cel·lulosa bacteriana són el cultiu estàtic i el cultiu agitat. Amb cada tècnica s'obté una cel·lulosa de morfologia diferent [28].

A través dels medis estàtics s'obté una cel·lulosa amb un mòdul de Young superior, amb més resistència als esforços de tracció, amb un major índex de cristal·linitat i un major grau de polimerització. És per això que la principal aplicació de la cel·lulosa obtinguda amb cultiu estàtic són els productes del camp de la medicina. Per a aplicacions menys exigents de cel·lulosa bacteriana, aquesta es pot obtenir amb un cultiu agitat [13].

Els períodes d'incubació són dependents del sistema de cultiu. En cultius agitats van de 24 a 72 hores mentre que en cultiu estàtic el període oscil·la entre 1 i 2 setmanes. [28]

Així doncs, és interessant estudiar l'efecte que té la tècnica de cultiu en la producció de cel·lulosa bacteriana.

En cultiu estàtic, la cel·lulosa s'obté en forma de gel el qual té aproximadament un 1% de cel·lulosa en pes.

Estudis realitzats mostren que en un primer estat, el microorganisme incrementa la seva població gràcies al consum d'oxigen dissolt que es troba en el medi de cultiu. Durant aquest temps, el microorganisme sintetitza una certa quantitat de cel·lulosa al medi líquid. En aquest punt, només les bactèries que es troben a prop de la interfase aire/medi de cultiu i tenen disponibilitat d'oxigen poden mantenir la seva activitat i produir cel·lulosa, la qual forma unes capes superposades. A mesura que transcorre el temps de fermentació, l'espessor de la pel·lícula s'incrementa per la generació de noves capes en la superfície, formant una estructura de capes suspeses al medi de cultiu. El principal inconvenient que presenta aquesta tècnica és l'elevat temps de fermentació i el requeriment d'una gran àrea superficial, fet que no fa pràctica la seva producció a gran escala [28].

Al realitzar fermentacions en cultiu agitat es poden obtenir uns pellets de cel·lulosa o aglomeracions amorfes de les fibres, les quals depenen del tipus de reactor i condicions d'operació utilitzats. Un estudi l'any 2013 va descobrir que el nombre d'esferes irregulars decreixia augmentant el volum de l'inòcul mentre que la variació en la concentració inicial de glucosa només tenia un impacte en el diàmetre d'aquests [28].

Aquests cultius poden realitzar-se per lots o en continu, en reactors de tanc agitat o airlift. El cultiu agitat s'investiga amb mires a escalar el procés a nivell industrial, però les baixes productivitats reportades fins ara fan que el seu escalatge sigui més complex.

La baixa productivitat obeeix al fet que l'agitació afavoreix el creixement de les cèl·lules no productores de polímer que consumeixen el substrat. Alguns autors atribueixen aquest fenomen a mutacions que lesionen la màquina enzimàtica encarregada de la polimerització de la glucosa [28].

Per altra banda, s'han aïllat i caracteritzat ceps altament productors en cultiu agitat, tals com l'*Acetobacter Xylinus* BCR5, l'*Acetobacter Xylinus* subsp. *Sucrofermentans* BPR2001 i l'*Acetobacter Xylinus* subsp. A9. Les produccions obtingudes són de 1.4, 4.0 i 2.3 vegades superiors a l'obtinguda utilitzant el cep caracteritzat ATCC 10245 [28].

Un inconvenient addicional que presenta aquest mètode de cultiu és l'habilitat de les cèl·lules d'*Acetobacter Xylinus* per convertir la glucosa en àcid glucònic i cetoglucònic, fet que consumeix la glucosa del medi en detriment del rendiment per a la cel·lulosa [28].

f) Teoria 4: tipus de fermentadors

La síntesi de cel·lulosa bacteriana, tal com s'ha vist en capítols anteriors, es duu a terme tant en cultiu estàtic com en cultiu agitat proporcionant l'aeració i l'agitació necessàries per la homogeneïtat del medi i per l'efectivitat de la transferència de massa. L'elecció de les condicions de cultiu depèn estrictament de l'ús final del polímer [1]. Per a dur a terme un cultiu agitat, els fermentadors utilitzats seran o BATCH, o fed-BATCH o CSTR. Per altra banda, si es tracta d'un cultiu estàtic, es poden utilitzar fermentadors tubulars o de flux pistó tals com els fermentadors de floculs, els de partícules (llit fix o llit fluïditzat), i els de pel·lícula o biofilm (el fermentadors de discs entraria dins aquesta classificació).

En aquest apartat es mostren, entre d'altres continguts, els diferents tipus de fermentadors on es pot dur a terme aquest procés.

En un procés de fermentació, els microorganismes tenen l'habilitat d'aconseguir qualsevol conversió que impliqui compostos orgànics solubles en aigua (incloent compostos de baixa solubilitat com ara els hidrocarburs), mitjançant unes complexes seqüències de reaccions catalitzades per enzims [30].

Històricament, no va ser fins a la primera meitat del segle XX quan es va produir el *boom* de molts processos de fermentació a nivell industrial. El desenvolupament comercial de la penicil·lina durant la Segona Guerra Mundial va proporcionar un estímul addicional de gran importància. En els anys de post guerra, aquesta evolució es va veure frenada pel creixement de la indústria petroquímica i la consegüent disponibilitat de productes químics bàsics que van fer comercialment atractiva la síntesi de dissolvents i àcids orgànics per sobre les fermentacions [30].

Actualment, el cost de les matèries primeres, el cost de l'aeració, i la baixa conversió del substrat són factors que incrementen el preu del producte final. És per això que s'estan realitzant diverses investigacions per resoldre aquests problemes mitjançant l'ús de substrats més barats, desenvolupat noves configuracions del fermentador que condueixin a eficiències d'aeració més altes, etc. [30].

Per cultivar microorganismes en unes condicions òptimes i per produir els metabòlits o enzims desitjats, cal tenir en compte una sèrie de factors tals com la manipulació genètica dels ceps utilitzats, la regulació del metabolisme optimitzant el medi de cultiu o el control adequat dels paràmetres que afecten al rendiment de la fermentació (temperatura, oxigen dissolt, pH, etc.) [31].

Un procés típic de fermentació consta dels anomenats processos de fermentació, i de la posterior recuperació del producte. Els processos de fermentació inclouen el desenvolupament de l'inòcul, la preparació dels medis, l'esterilització, la fermentació pròpiament i el control dels factors físico-químics. Per altra banda, la recuperació del producte es fa extraient o purificant [31].

Així doncs, la fermentació comença amb l'esterilització del medi de cultiu i de l'equip. Les cèl·lules creixen primer en un medi de cultiu de manteniment, posteriorment en un matràs i d'aquí es passa a un prefermentador per acabar inoculant el fermentador de producció. Una vegada la fermentació s'ha completat, les cèl·lules es separen del cultiu líquid. Si el producte és intracel·lular, les cèl·lules es trenquen i se n'eliminen les restes cel·lulars mentre que si el producte és extracel·lular, es purifica, com és el cas de la producció de cel·lulosa bacteriana [32].

Quan es duu a terme una fermentació cal tenir en compte una sèrie de factors; per una banda cal que les condicions de creixement dels microorganismes siguin òptimes, també cal esterilitzar el medi per evitar contaminacions, netejar correctament per evitar que les impureses afectin a la conversió, mantenir constants el pH, la temperatura, l'oxigen dissolt, el substrat i la concentració de producte.

F.1.- Factors físico-químics que afecten al rendiment de les fermentacions industrials

Tal i com s'ha explicat en la Teoria 3 per al cas concret de la fermentació per a la producció de cel·lulosa bacteriana, hi ha una sèrie de factors físico-químics que afecten al rendiment de les fermentacions a nivell industrial. Aquests són l'oxigen dissolt, la temperatura, el pH i l'agitació.

OXIGEN

Un dels factors més crítics en l'operació de fermentació a gran escala és el subministrament d'un intercanvi de gasos adequat. L'oxigen és el substrat gasós més important per al metabolisme microbià i l'anhidrid carbònic és el producte metabòlic més important. L'oxigen no és un gas gaire soluble ja que una solució saturada d'oxigen conté aproximadament 9 mg/L d'aquest gas en aigua. Degut a la influència dels ingredients de cultiu, el contingut màxim d'oxigen realment és mes baix del que hauria de ser en aigua pura. El subministrament s'aconsegueix polvoritzant aire al fermentador durant el procés.

La llei de Henry descriu la solubilitat de l'oxigen en solucions de nutrients en relació a la pressió parcial de l'oxigen en fase gasosa:

$$c = H \cdot p$$

En aquesta equació, c és la concentració d'oxigen de la solució de nutrients a saturació, p és la pressió parcial del gas en fase gasos i H és la constant d'Henry que és específica per cada tipus de gas. A mesura que augmenta la concentració d'oxigen en la fase gasosa, augmenta la proporció d'oxigen en la solució de nutrients. En conseqüència, la pressió més alta d'oxigen s'aconsegueix durant l'aeració amb oxigen pur. Comparat amb el valor obtingut a l'utilitzar aire (9 mg O₂/L), en aigua es dissolen 43 mg O₂/L quan s'utilitza oxigen pur. Una altra característica és que a mesura que augmenta la temperatura decreix la solubilitat de l'oxigen.

Un cop dissolt, l'oxigen ha de transferir-se des de la bombolla de gas a cada cèl·lula individual. Per això han de ser superades diferents resistències parcialment independents; la resistència dins la pel·lícula de gas a la interfase, la penetració de la interfase entre la bombolla de gas i el líquid, la transferència des de la interfase al líquid, els moviments dins la solució de nutrients i la transferència a la superfície de la cèl·lula.

En les fermentacions que es duen a terme amb organismes unicel·lulars com ara bacteries o llevats, el factor més important que controla la velocitat de transferència és la resistència en la interfase entre la bombolla de gas i el líquid. Les cèl·lules microbianes pròximes a la bombolla de gas poden absorbir directament l'oxigen a través de la interfase augmentant la transferència del gas cap a aquestes cèl·lules. En els aglomerats de cèl·lules o en les boles de miceli, la transferència de gas dins l'aglomerat pot ser un factor limitant.

Per últim, la concentració crítica d'oxigen és el terme utilitzat per expressar el valor de la velocitat específica d'absorció d'oxigen que permet la respiració sense impediments. Aquesta concentració crítica d'oxigen sol tenir uns valors concrets per cada microorganisme oscil·lant de forma general entre el 5% i el 25% dels valors de saturació d'oxigen en els cultius [32].

TEMPERATURA

La temperatura és un altre dels paràmetres essencials per l'èxit d'una fermentació. Els microorganismes que creixen a una temperatura inferior a l'òptima tenen un retràs en el creixement i per tant una reducció de la producció cel·lular. Per una banda, si la temperatura és massa alta, però no letal, es pot induir una resposta d'estrès al xoc tèrmic amb la consegüent producció de proteases cel·lulars que ocasionen una disminució en el rendiment dels productes proteics. Per tal d'obtenir rendiments òptims, les fermentacions s'han de dur a terme en un marge estret de temperatura i a ser possible constant. La velocitat de producció de calor deguda a l'agitació i a l'activitat metabòlica dels microorganismes no es veu compensada per les pèrdues de calor que resulten de l'evaporació, cosa que provoca que s'hagi de recorre a sistemes de refrigeració. Dins d'aquests, els més utilitzats en les fermentacions industrials són les camises d'aigua [32].

PH

La major part dels microorganismes creixen de manera òptima amb un pH d'entre 5,5 i 8,5, però durant el creixement en un fermentador, els metabòlits cel·lulars són alliberats al medi, fet que pot originar canvis de pH al medi de cultiu. Cal controlar el pH del medi afegint un àcid o una base i mesclar-lo ràpidament quan sigui necessari per mantenir el pH constant [32].

AGITACIÓ I MESCLAT

L'agitació és l'operació que crea o que accelera el contacte entre dues o diverses fases. Una fermentació microbiana pot ser considerada com un sistema de tres fases, que implica reaccions líquid-sòlid, gas-sòlid i gas-líquid.

La fase líquida conté sals dissoltes, substrats i metabòlits. Pot existir, en alguns casos, una segona fase líquida si existeix un substrat immiscible en aigua com ara els alcans.

La fase sòlida consisteix en cèl·lules individuals, boles de miceli, substrats insolubles o productes del metabolisme que precipiten.

La fase gasosa proporciona un reservori pel subministrament d'oxigen, per l'eliminació del CO₂ o per l'ajust del pH amb amoni gasós.

Una agitació adequada d'un cultiu microbià és essencial per la fermentació, ja que produeix els següents efectes en les tres fases:

1. Dispersió de l'aire en la solució de nutrients
2. Homogeneïtzació per igualar la temperatura, pH i concentració de nutrients al fermentador
3. Suspensió dels microorganismes i dels nutrients sòlids
4. Dispersió dels líquids immiscibles

Sota aquestes premisses es podria concloure que amb major agitació, millor serà el creixement. Tot i així, l'agitació excessiva pot trencar les cèl·lules grans i incrementar la temperatura provocant un descens en la viabilitat cel·lular. Per tant, cal aconseguir un equilibri entre la necessitat de mesclar i la necessitat d'evitar el dany cel·lular.

Els diferents tipus d'agitació que s'utilitzen en les fermentacions s'inclouen dins dels següents tipus:

1. Agitadors rotatius; tenen un sistema mecànic d'agitació
2. Columnes de bombolles; l'agitació es realitza mitjançant la introducció d'aire a sobrepressió

3. El sistema Airlift; pot tenir un circuit intern o extern. La mescla i circulació dels fluids són el resultat de les corrents d'aire introduïdes, les quals causen diferències en la densitat dins de les diferents parts del fermentador.

D'aquests tres tipus, el més utilitzat és el primer, ja que és més flexible en les condicions d'operació, és més fàcil d'aconseguir comercialment, aporta una transferència de gasos a la cèl·lula eficient i és el tipus del qual se'n té més experiència [32].

MODELS DE CREIXEMENT

Al llarg del temps s'han proposat diferents models per la taxa de creixement. El model més antic data de l'any 1938 i va ser proposat per Verhulst. Aquest model expressa la velocitat de creixement com una funció de la concentració de biomassa, tal com es mostra a l'equació 1, on:

μ_{max} és la velocitat màxima de creixement

M és una constant

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{x^{(1)}}{M} \right) \quad \text{Eq. 1.1}$$

El model més utilitzat, però, es basa en la llei de Michaelis-Menten, introduïda l'any 1913 per descriure una reacció enzimàtica. En l'equació 2 es mostra aquest model on :

$x^{(2)}$ és la concentració del substrat

K_s és la constant de saturació

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{x^{(2)}}{K_s + x^{(2)}} \right) \quad \text{Eq. 1.2}$$

Arribat a aquest punt en què s'han comentat tant els diferents tipus de fermentacions que es poden dur a terme com els factors físico-químics que afecten a aquestes, cal posar èmfasi en els criteris més importants a tenir en compte a l'hora de dissenyar un fermentador i als diferents fermentadors que existeixen actualment [33].

Els criteris més importants a tenir en compte quan es dissenya un fermentador es mostren a la Taula 7.

Dissenyar per a que funcioni asèpticament durant tot el temps que dura l'operació
Proporcionar un sistema adequat d'aeració i agitació per cobrir les necessitats metabòliques dels microorganismes
El consum d'energia ha de ser el mínim possible
Cal que hi hagi un sistema de control de pH
El fermentador ha de tenir un sistema per la presa de mostres
Cal que existeixi un sistema de control de temperatura
Reduir al mínim les pèrdues per evaporació
El disseny del tanc ha de ser tal que les operacions laborals durant el funcionament, recol·lecció, neteja i manteniment siguin mínimes
El tanc ha de ser versàtil per a l'aplicació de diverses modalitats de processos
Les superfícies internes del tanc han de ser llises i unides per soldadures
La geometria del fermentador ha de ser similar a la d'altres tancs més petits o majors de la planta o als de la planta pilot per poder reproduir els processos a diferents escales
S'han d'utilitzar els materials més barats que produeixin resultats satisfactoris
Cal que existeixi un servei adequat de recanvis per al fermentador

Taula 7: criteris que cal tenir en compte quan es dissenya un fermentador

El manteniment d'un ambient asèptic i unes condicions aeròbiques són probablement els dos punts de major rellevància que cal considerar. Els fermentadors més utilitzats a nivell industrial consten de mecanismes d'agitació, dispersió i aeració així com de sistemes per al control de pH, temperatura i formació d'espuma [32].

Els diferents processos de fermentació, així com els diferents tipus de fermentadors que existeixen es poden classificar de manera general com: fermentacions discontinues (batch), fermentacions alimentades (fedbatch), fermentacions contínues (CSTR) i fermentacions de retenció cel·lular. A continuació s'explica cada un d'aquests tipus de fermentació. En la Figura 27 es mostra un petit esquema de cada tipus de bioreactor.

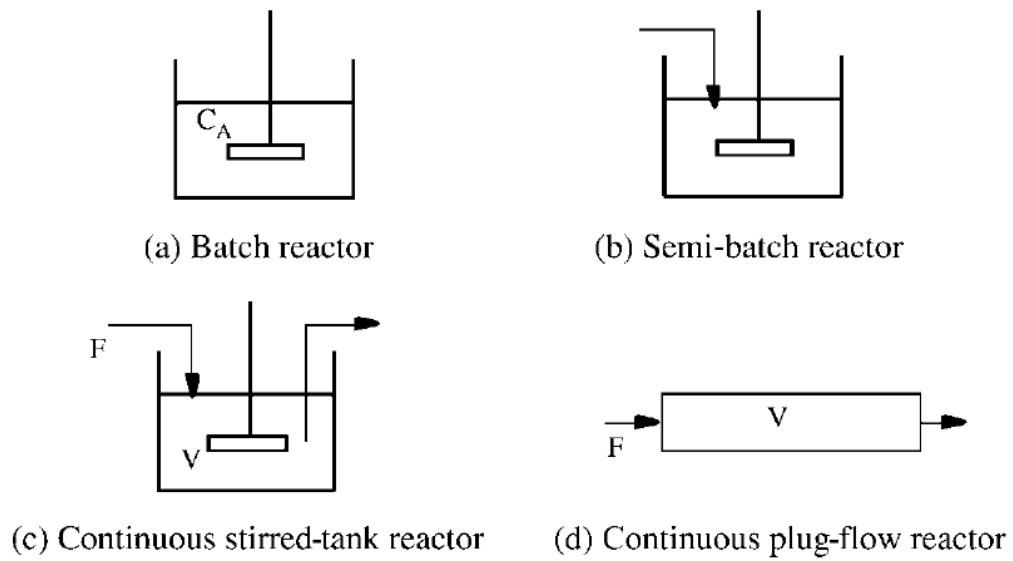


Figura 27: Esquema de cada tipus de bioreactor

F.2.- Fermentació batch (discontínua)

Una fermentació discontínua (en batch) pot ser considerada com un sistema tancat. A l'inici de l'operació s'afegeix la solució esterilitzada de nutrients i s'inocula el medi de cultiu amb el microorganisme que interessi, permetent que es dugui a terme la incubació en condicions òptimes de fermentació i que s'assoleixi la conversió requerida [32] [31]. En la Figura 28 es mostra una fotografia d'un fermentador batch.



Figura 28: fotografia d'un fermentador batch

Els processos microbiològics duts a terme de forma discontinua impliquen una sèrie d'etapes que inclouen el desenvolupament dels microorganismes a partir d'un cultiu patró. El primer pas, doncs, consisteix en desenvolupar un cultiu sobre la superfície de medi nutrent estèril solidificat per addició d'agar. Posteriorment, el fermentador de sembra s'utilitza per produir l'inòcul per al fermentador de producció industrial [30] [34].

Una vegada ja s'ha afegit el substrat al fermentador de producció industrial no s'hi afegeix res més excepte oxigen o aire si es tracta d'un cultiu aeròbic, i un agent antiespumant per evitar la formació d'espuma, ja que les fermentacions són propenses a la formació d'aquesta com a conseqüència de la presència de metabòlits amb propietats tensioactives que poden conduir a una considerable disminució del volum de líquid. Alguns agents antiespumants que s'utilitzen són; olis naturals i minerals, alcohols superiors, àcids grassos i silicones [30] [34]. Per altra banda, també s'afegeixen àcids o bases per controlar el pH [31] [32] [35].

La composició del medi de cultiu, la concentració de biomassa i la concentració de metabòlits canvia al llarg del procés com a resultat del metabolisme de les cèl·lules observant-se les quatre fases típiques de creixement: fase de latència, fase logarítmica, fase estacionària i fase de mort [31] [32].

L'àrea de transmissió de calor en un fermentador discontinu s'ha de calcular perquè es puguin subministrar les quantitats de calor corresponents a l'esterilització i el refredament, així com les associades al funcionament normal. Les variables al llarg de la fermentació són: calor de reacció, energia dissipada per l'agitador, energia dissipada per l'aire en passar pel medi líquid i pèrdues de calor en la corrent d'aire degut als canvis de temperatura i humitat [30] [34].

Per aconseguir l'agitació necessària, s'utilitzen impulsors que produeixen un flux radial. La selecció de l'impulsor i de la velocitat de funcionament està basada en dades obtingudes amb sistemes similars o bé sobre un estudi detallat de planta pilot [30] [34].

L'esterilització dels medis s'aconsegueix generalment amb vapor, mentre que l'aire subministrat s'esterilitza per la temperatura aconseguida al compressor, seguida pel pas a través d'un medi filtrant fibrós. És normal utilitzar un filtre addicional a la sortida de l'aire per evitar la infecció en el cas de que part d'aquest aire fos aspirat novament a la instal·lació [30] [34].

En els processos comercials, la fermentació normalment s'interromp al final de la fase logarítmica (metabòlits primaris) o abans que comenci la fase de mort (metabòlits secundaris), que coincideix amb el moment en què s'acaba el substrat i s'assoleix la conversió desitjada [31] [32].

L'avantatge d'una fermentació batch rau principalment en el fet que és el mètode més utilitzat i conegut fins ara i que es requereixen unes instal·lacions relativament simples [31] [32].

En la Figura 29 es mostra com varia la concentració de cèl·lules i de substrat a mesura que avança el temps de fermentació. Tal i com es pot observar, a mesura que desapareix el substrat es va creant producte.

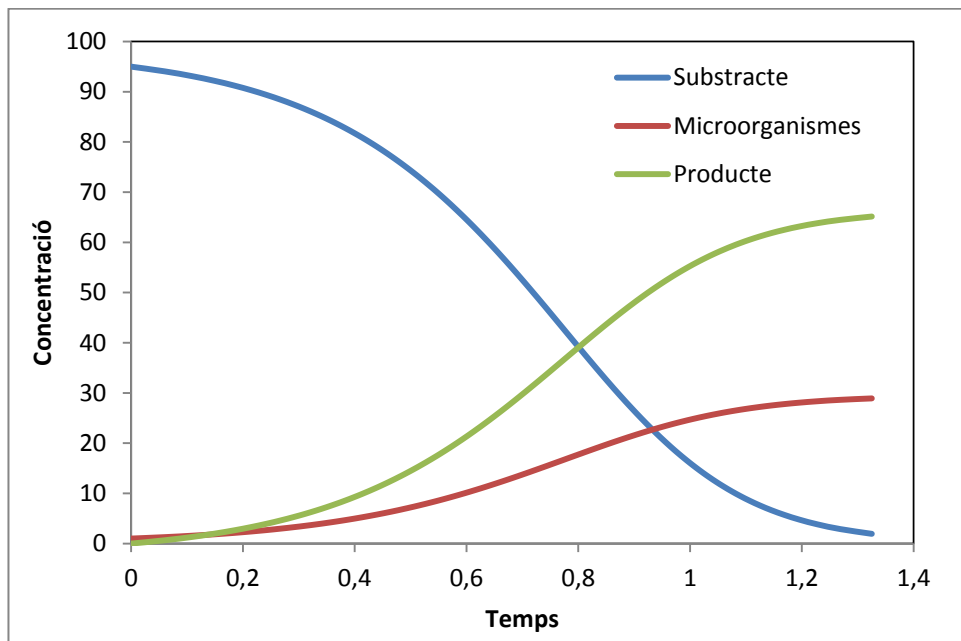


Figura 29: Gràfica concentració/temps per un fermentador batch

Una fermentació batch es caracteritza, doncs, pel creixement dels microorganismes sense subministrament addicional de substrat un cop s'ha inoculat. Mentre que el substrat es metabolitza, la biomassa i els productes es van formant durant el cultiu. La fermentació

s'atura quan la concentració de producte desitjat arriba al màxim. Posteriorment, el reactor es neteja i s'esterilitza per la següent fermentació [35].

No obstant, quan es vol dur a terme un procediment continu de diverses fermentacions batch, la primera etapa comença amb un cultiu i a l'inici de cada etapa següent en comptes de retirar tot el volum se'n deixa una part al reactor que serveix com a inòcul per al següent procés, al qual s'afegiran medis frescos i esterilitzats. Aquest procés es pot repetir fins al moment en que la producció disminueix [35]. El sistema de múltiples etapes té certs avantatges; la productivitat és més elevada per un volum de fermentador menor i hi ha possibilitat de variar les condicions ambientals d'etapa en etapa, fet que permet que algunes etapes siguin utilitzades per al creixement microbià, i altres per a la producció bioquímica [30] [34].

El problema que presenta aquest sistema, és que les condicions inicials de cada batch no són totalment conegudes, ja que són residus d'altres batch i això pot influenciar el cultiu. Tot i això, són processos senzills i àmpliament utilitzats.

El límit en un procés batch el determina la concentració de substrat inicial, tenint en compte que concentracions massa altes poden inhibir el creixement dels microorganismes [35].

En els bioreactors batch no existeix ni flux d'entrada ni de sortida, per tant direm que:

$$Q_{\text{ent}} = Q_{\text{sort}} = 0$$

En aquest cas, les equacions que el modelen queden de la següent manera [33]:

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 v \quad \text{Eq. 2.1}$$

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2 v \quad \text{Eq. 2.2}$$

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{Eq. 2.3}$$

La disposició bàsica del fermentador és un fermentador tipus tanc profund [30] [34].

El temps requerit per una fermentació discontinua varia d'hores a setmanes, en funció de la conversió que es desitgi i de les condicions utilitzades. Durant aquest temps, cal evitar la contaminació agitant el contingut del tanc i mantenint la temperatura controlada [30] [34].

El control de la temperatura s'aconsegueix posant una camisa d'aigua al voltant del tanc, acompanyat per la utilització de serpentins interns amb la finalitat d'aconseguir una superfície suficient de transmissió de calor [30] [34].

El problema de disseny d'un fermentador tipus tanc profund resideix en l'especificació de la mida del tanc, el temps que dura el procés, la quantitat de microorganismes retinguts, les necessitats d'aeració i de potència, i de l'àrea de superfície de transmissió de calor [30] [34].

Les condicions òptimes per al creixement i la formació de producte són diferents termes de temperatura i pH, i en el grau d'aeració i agitació requerits [30] [34].

A la Taula 8 es mostren diferents tipus de fermentadors discontinus en funció de com es produeix l'aeració.

Injecció d'aire a través de l'agitador	L'aire passa per un eix buit i és injectat al medi a través dels forats a l'agitador.
Injecció de dues fases	Una mescla de dues fases d'aire i medi nutritiu passa al fermentador en forma d'espuma o suspensió.
Fermentador amb transport per aire	L'aire s'utilitza per fer circular els productes continguts al fermentador, tant per tubs externs al recipient o utilitzant un tub interior.
Injecció d'aire per distribuïdor	El fermentador més utilitzat és el cilíndric vertical agitat, amb deflectors i amb un distribuïdor d'aire.

Taula 8: Tipus de fermentadors discontinus (o batch)

Els possibles elements mecànics dels quals consten els fermentadors o el possible equip auxiliar utilitzat es mostren a la Taula 9 [30] [34].

1	Registre i control de la temperatura
2	Termoresistència
3	Vàlvules de control
4	Nivell del fermentador
5	Registre i control del pH

6	Concentració de substrat
7	Rotàmetres per les alimentacions
8	Control d'espuma
9	Detectors d'espuma
10	Unitat de potència
11	Venturis

Taula 9: elements mecànics dels fermentadors

F.3.- Fermentació alimentada (fed-batch)

En els processos convencionals de fermentacions discontinües que s'acaben de descriure, tots els substrats s'afegeixen al principi de la fermentació.

Per contra, en les fermentacions alimentades, els substrats s'afegeixen esglaonadament a mesura que progressa la fermentació mantenint constant la concentració del substrat durant tot el temps que duri el procés [31] [32]. Aquest sistema permet solucionar la limitació de creixement que implica la restricció de la concentració del substrat inicial, ja que es pot afegir més substrat a mesura que avança el cultiu [35].

La formació de molts metabòlits secundaris està sotmesa a repressió catabòlica (efecte glucosa). Per aquesta raó en el mètode alimentat els elements crítics de la solució de nutrients s'afegeixen en petites concentracions al principi de la fermentació i continuen afegint-se a petites dosis durant la fase de producció. És també un mètode clàssic i conegut que sol millorar la producció respecte la fermentació discontinüa [31] [32].

En la Figura 20 es mostra com varia la concentració de cèl·lules i de substrat a mesura que avança el temps de fermentació.

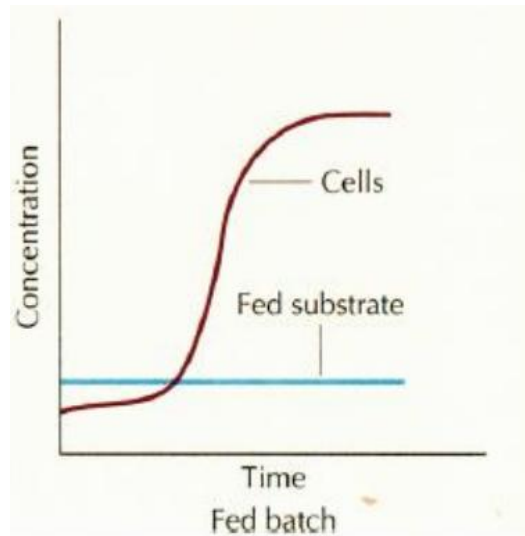


Figura 30: gràfica concentració/temps per un fermentador fedbatch

En funció del bioprocés que es desitgi realitzar, es poden distingir diferents tècniques de fed-batch [35]:

- Índex de creixement constant o predefinit: per mantenir un creixement estable o exponencial, el flux de substrat ha d'anar creixent exponencialment. Un creixement lineal s'aconsegueix amb un flux de substrat constant.
- Bioprocés que requereix una concentració de substrat constant: per mantenir constant la concentració de substrat al medi, aquesta s'ha de mesurar o estimar. L'alimentació de substrat s'ajusta en funció de la mesura. Tot i això, aquesta estimació és complexa.
- Fed-batch amb limitació de substrat: molts bioprocessos requereixen una concentració baixa de substrat per a que la producció de substrat sigui òptima. En aquest cas, el substrat s'ha de subministrar de manera contínua amb una bomba.
- Alimentació controlada per pressió d'oxigen: aquest cas és una variació del cas anterior. S'utilitza quan es necessiten concentracions de substrat baixes. En aquest tipus d'alimentació, la pressió d'oxigen dissolt augmenta si es redueix l'alimentació i viceversa. Aquest comportament s'utilitza per automatitzar l'alimentació controlada.

En un bioreactor fed-batch no hi ha flux de sortida, és a dir; $Q_{\text{sortida}}=0$ [33].

En aquest cas les equacions queden de la següent manera:

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 v \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2Vx^{(1)} + Qent X_0^{(2)} \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$\frac{dV}{dt} = Qent \quad \text{Eq. 3.3}$$

El tanc conté inicialment una petita quantitat de substrat i biomassa i durant el procés es va incorporant substrat. Tal com es mostra a la Figura 31, hi ha constantment una entrada d'alimentació.

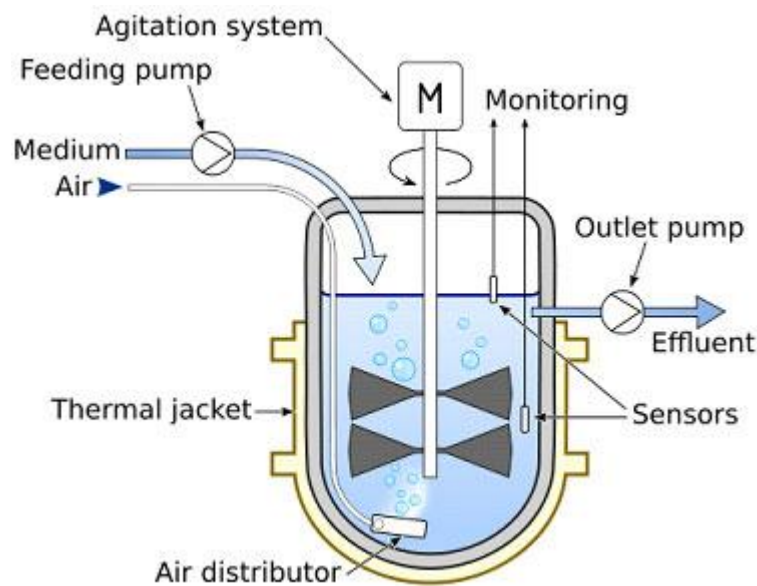


Figura 31: Esquema d'un bioreactor fed batch

F.4.- Fermentació contínua (CSTR)

La fermentació contínua s'estableix com un sistema obert. La solució nutritiva estèril s'afegeix contínuament al bioreactor i una quantitat equivalent de solució utilitzada dels nutrients amb els microorganismes es treu simultàniament del sistema. Al ser un procés continu, hi ha una bona utilització dels materials, però per contra suposa certs problemes per mantenir l'estabilitat ja que hi ha més possibilitats de que el sistema es contaminei .

L'objectiu fonamental de la indústria de les fermentacions és sempre minimitzar els costos i incrementar els rendiments. Aquest objectiu pot assolir-se si es desenvolupa el tipus de fermentació més adequat per cada cas particular.

Tot i que els processos de fermentació contínua no són els més utilitzats en la indústria, degut al major nivell d'experiència que es té en la fermentació discontinua, el cost de

producció de biomassa mitjançant el cultiu continu és potencialment inferior al del cultiu discontinu [30] [31] [36].

No obstant, només alguns processos han resultat útils per l'aplicació pràctica de fermentació en continu degut a diverses raons; per una banda, molts mètodes de laboratori operen de manera contínua durant només de 20 a 200 hores i per a que sigui d'utilitat a nivell industrial, el sistema ha de ser estable durant almenys de 500 a 1000 hores. Per altra banda, mantenir les condicions estèrils a escala industrial durant un període de temps és difícil. La composició dels substrats ha de ser constant per obtenir una producció màxima i la composició de les solucions de nutrients industrials són variables (peptona, CSL, etc.), cosa que pot originar canvis en la fisiologia de la cèl·lula i disminuir-ne la productivitat. Per últim, quan s'utilitzen ceps d'alt rendiment, es produeixen mutants degenerats els quals poden créixer en un cultiu continu més de pressa que els ceps de producció, fet que disminueix el rendiment amb el temps, ja que cada vegada són menys les cèl·lules que sintetitzen el producte d'interès [30] [31] [36].

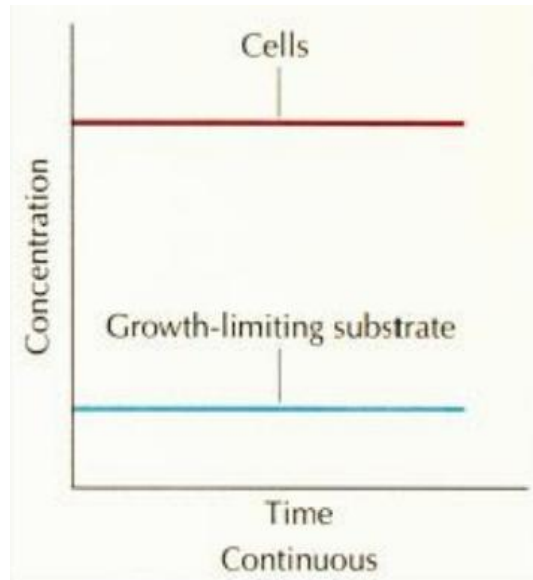


Figura 32: gràfica concentració/temps per un fermentador continu

El cultiu continu, doncs, és una operació caracteritzada per l'addició de manera contínua de medi fresc. Els nutrients frescos que promouen el creixement s'afegeixen al sistema mentre que els inhibidors de creixement es retiren. El paràmetre que caracteritza una fermentació en continu és el factor de dilució D ;

Eq. 4.1

$$\frac{d(Vx^{(1)})}{dt} = r_1 v - Qx^{(1)}$$

$$\frac{d(Vx^{(2)})}{dt} = -r_2 v + Qx_0^{(2)} - Qx^2$$

Eq. 4.2

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad \text{Eq. 4.3}$$

On F representa el flux de medi fresc i V_L el volum del cultiu [35].

L'avantatge principal del cultiu en continu és el fet que la productivitat és indefinida (de manera teòrica). Sovint s'utilitza per organismes amb creixement lent.

La productivitat en un procés continu està limitada pel rentat dels equips i pel factor de dilució D (existint un factor D màxim).

Així doncs, en un cultiu continu, el bioreactor està sent contínuament alimentat pel substrat, i el flux de sortida és igual al flux d'entrada mantenint-se constant el volum del cultiu [33].

$$Q_{\text{ent}} = Q_{\text{sort}} = Q \quad \text{Eq. 5}$$

En el fermentador continu de tanc agitat (FCTA) o *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR), l'agitació és una característica important, considerant que una bona aproximació a la mescla perfecta no és difícil d'assolir mentre que la fase fluida no sigui gaire viscosa. L'efecte d'una bona mescla de tots els elements del fluid al tanc, és que tinguin la mateixa composició [30] [31].

En aquests bioreactors, el control de la temperatura i el pH és relativament fàcil.

Aquests reactors són de composició oberta i per tant la neteja de les superfícies internes és més fàcil que en altres fermentadors, fet molt important en les condicions asèptiques.

En un fermentador continu, la mescla es troba en estat estacionari. Les condicions d'estat estacionari poden assolir-se sota els principis següents:

-Quimiostàtics: impliquen ajustar el cabal d'alimentació del fermentador a un valor apropiat i constant, permetent a les concentracions de microorganismes, al substrat i al producte bioquímic assolir els seus nivells naturals

-Terbolestàtics: requereix una determinació experimental de la terbolesa, una mesura indirecta de la concentració microbiana per al control del cabal.

Els sistemes continus amb més èxit fins el segle XX han estat els que utilitzen llevats i bacteries, en els que els productes desitjats són les cèl·lules o els metabòlits primaris com el llevat del pa, la proteïna microbiana o algun producte clarament associat amb el creixement dels mecanismes productors d'energia.

No hi ha cap raó per la qual qualsevol fermentació no pugui ser assolida en processos continus, però quan l'objectiu són els metabòlits secundaris, la situació és menys encoratjadora i és menys probable que s'arribi a resultats satisfactoris a causa dels diferents requeriments ambientals entre les etapes de creixement i producció [30] [31].

En el procés continu, la naturalesa autocatalítica de les reaccions microbiològiques tenen una significació addicional. Degut a la presència d'un dels productes, microorganismes addicionals, augmenta la velocitat total de la reacció. Si el cabal arriba a assolir un valor elevat, tots els microorganismes seran arrossegats fora del fermentador i la conversió s'aturarà. Aquest fet es coneix com arrossegament o rentat. Si els microorganismes s'introdueixen al fermentador simultàniament amb el substrat, els problemes associats amb l'arrossegament disminueixen i la reacció transcorre de manera normal. Operar sota aquestes condicions requereix un flux continu de microorganismes idèntics als que existeixen dins el fermentador. L'efluent pot passar-se a través d'una centrífuga o bé per medi d'un tanc de sedimentació, per produir una suspensió microbiana concentrada per ser reciclada al fermentador [30] [31]. En la Figura 33 es mostra un esquema d'un CSTR amb un separador de microorganismes.

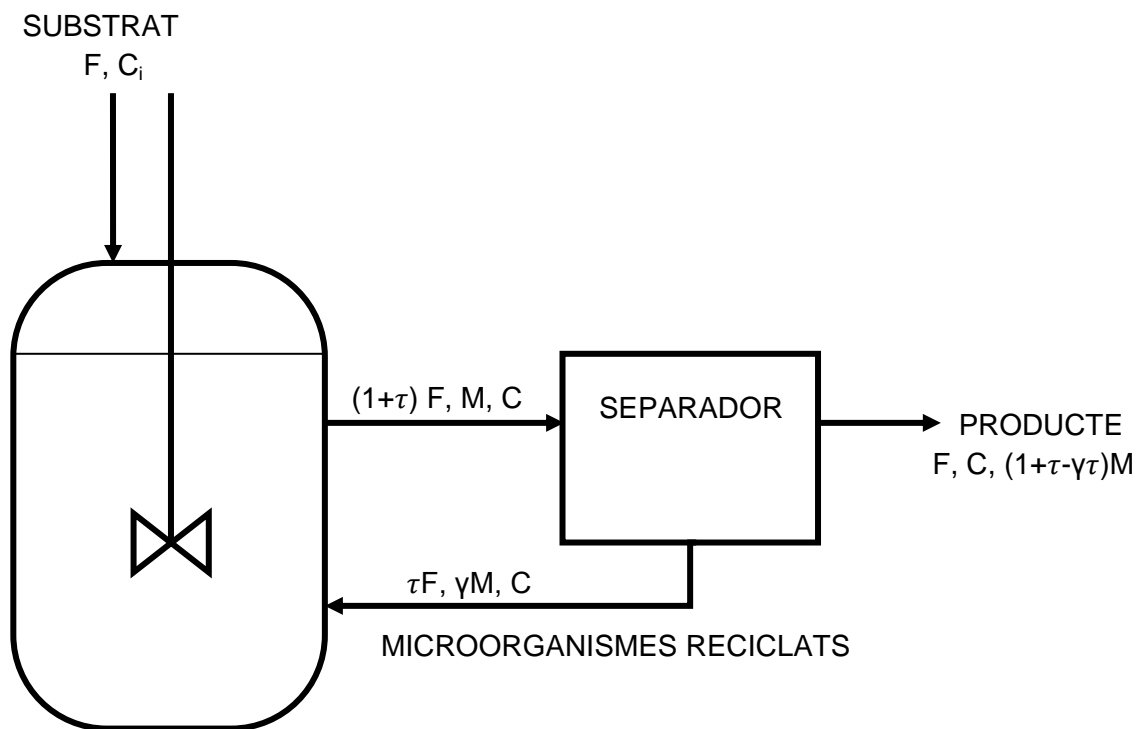


Figura 33: Esquema d'un CSTR amb separador de microorganismes

Una aflluència constant d'organismes no només soluciona el problema de l'arrossegament sinó que produeix un increment de la productivitat degut a l'increment de microorganismes retinguts dins el fermentador.

En els fermentadors en sèrie, si els microorganismes estan presents en el primer fermentador, aleshores tot i que el cabal a través dels diferents fermentadors augmenti en la direcció com a resultat de l'addició de substrat, no es pot produir l'arrossegament.

Els sistemes de etapes múltiples són particularment útils quan en els processos discontinus equivalents és necessari variar les condicions ambientals, durant el transcurs de la reacció. És a dir, es proporcionen les condicions ambientals necessàries en cada una de les etapes. Això passa quan en els processos discontinus:

- Els productes es formen cap al final de la fase exponencial en el curs de la fase estacionària

- Els productes es formen independentment de la velocitat de creixement microbià

- El producte és el resultat d'una seqüència de reaccions químiques i microbiològiques successives

Una forma alternativa del FCTA va ser descrita per Kitai i Yamagata l'any 1970. Consisteix en un tub dividit en seccions iguals per plats perforats horitzontals. El fermentador va ser ideat per utilitzar-se en condicions aeròbiques amb les entrades del medi i de l'aire coincidents en la base de la columna. Durant l'operació poden ajustar-se els valors de manera que es mantingui una quantitat de líquid determinada en cada plat amb un espai d'aire per sobre. Sota aquestes condicions el fermentador funciona exactament com un FCTA actuant cada secció o etapa com una dels fermentadors en sèrie [30] [31].

Un altre cas particular dels fermentadors CSTR són els fermentadors de columna de bombolleig.

Els fermentadors de columna de bombolleig o *airlift*, poden ser una alternativa molt atractiva per als CSTR, en particular per a bioprocessos amb reactius o productes gasosos. Tot i així, són susceptibles a ser limitats per la transferència de massa gas-líquid i per la mescla "pobra" de la fase líquida, particularment quan treballen amb cèl·lules d'alta densitat [37].

Malgrat l'accelerat desenvolupament dels bioreactor degut al seu extens ús, encara hi ha dificultats en mantenir l'estabilitat dels processos. L'agitació tradicional utilitzant tancs CSTR dona uns bons rendiments, però requereixen molta aportació energètica. Això fa que la reducció energètica en l'agitació a gran escala sigui un dels reptes més interessants. Com a resposta a aquest objectiu, apareix el reactor airlift. Aquest ha estat utilitzat diverses vegades en aplicacions industrials que requereixen contacte gas-líquid [37].

Perquè circulin les cèl·lules i els medis de nutrients s'utilitza aire pressuritzat. Cada reactor airlift consta de dues regions; en la regió interna l'aire es mou cap a dalt amb

injecció de gas, mentre que en la regió externa, el medi està desgassificat. El gradient de densitat entre aquestes dues regions provoca l'agitació dins del tanc [38].

Aquest tipus de reactors es poden classificar de manera general en dos grups; els airlift de bucle extern, on la circulació es duu a terme en conductes separats, i els airlift de bucle intern, en els quals la circulació es produeix a través d'un tub o plat dins del reactor [37].

A més de la bona agitació, els reactors airlift consten de llargs temps de contacte i no causen danys de cisalla a les cèl·lules. Tots aquests avantatges poden millorar-se considerablement equipant els reactors amb un oscil·lador que generi microbombolles augmentant enormement l'àrea interfacial entre les fases líquides i les fases gasoses [37] [38].

A la Figura 34 es mostren els dos tipus de reactors, airlift de bucle extern (a) i airlift de bucle intern (b).

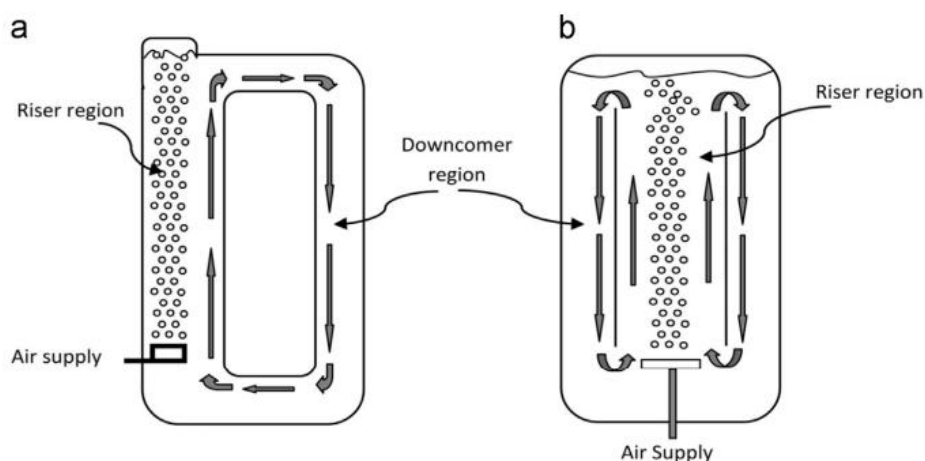


Figura 34: Airlift de bucle extern (a) i airlift de bucle intern (b)

Els avantatges dels airlift són bàsicament les següents:

- L'airlift realitza dues funcions en una; l'aeració i bona distribució de gas i l'agitació homogènia
- No hi ha punts focals de dissipació d'energia o calor
- No consten de cap agitador dins del tanc

Els factors claus a tenir en compte són; la regulació de la mida de les bombolles, el temps de residència de les bombolles, la circulació del líquid i la injecció del gas [38].

Els airlift s'utilitzen majoritàriament en cultius de cèl·lules de mamífers, en tractament d'aigües residuals, en processos biològics amb biocatalitzadors sòlids i en biofarma per a proteïnes de cèl·lules fràgils [38]. En la Figura 35 es mostra una fotografia d'un fermentador airlift.



Figura 35: fermentador airlift

F.5.- Fermentació amb reactors tubulars

La massa microbiana en un fermentador pot existir en dues disposicions; suspesa lliurement o adherida a les superfícies del fermentador. La millor configuració és funció de la proporció de massa microbiana total que hi hagi en cada una des les disposicions.

Els microorganismes en suspensió habitualment s'agrupen en flòculs, d'una mida característica diverses vegades major que un microorganisme senzill. Els agents floculants com per exemple els clorurs alumínic i càlcic ajuden a augmentar la mida d'aquests flòculs, i per contra, les forces de cisalla produïdes per l'agitació o els tensioactius la poden disminuir [30].

Per altra banda, els organismes col·locats en una superfície inerta desenvolupen una pel·lícula que cobreix aquest superfície, l'espessor del qual depèn de factors similars als que contribueixen a la formació de flòculs [30].

En els fermentadors BATCH i CSTR descrits anteriorment, els microorganismes es troben suspesos i sovint creen flòculs força grans, fet que



Figura 36: fermentador tubular

influeix en detriment al rendiment. En alguns dels fermentadors tubulars, per contra, s'immobilitzen les cèl·lules de manera que no es danyin els productes sensibles als esforços tallants.

En la Figura 36 es mostra una fotografia d'un fermentador tubular.

Un reactor d'enzims o cèl·lules immobilitzades consisteix en passar el medi fresc a través d'un bioreactor en el que per diferents tècniques s'han immobilitzat cèl·lules o enzims. En el bioreactor es produeixen les transformacions bioquímiques desitjades i es recupera el producte transformat després del seu pas per la columna. Amb aquest sistema s'eliminen els problemes de desequilibri del sistema continu clàssic i a més el producte resultant està lliure de cèl·lules. Tot i així presenta l'inconvenient que no tots els microorganismes poden immobilitzar-se.

Existeixen tres mètodes d'immobilitzar les cèl·lules [30][34]:

- Associació física mitjançant resines d'intercanvi iònic. La unió es pot trencar fàcilment.
- Unió covalent mitjançant glutaraldehyd, toluè, di-isocianat, iode acetil cel·lulosa. Aquesta unió es manté forta després d'inactivar-la.
- Mitjançant col·lagen, gelatina, agar, alginats, poliacrilamida o poliestirè. És el mètode més utilitzat en immobilització de cèl·lules. Les cèl·lules es mesclen amb el polisacàrid líquid i posteriorment es deixa refredar perquè solidifiqui. Finalment es fragmenta o granula i s'empaqueta en una columna.

Per solucionar la limitació de producció en un cultiu en continu, els organismes s'han de retenir d'alguna manera al reactor, d'aquesta manera es permetria incrementar la densitat cel·lular i el factor de dilució, incrementant així la productivitat [35].

Les conversions bioquímiques no s'assoleixen en absència de microorganismes. S'entén que a l'utilitzar els microorganismes suspesos en un fermentador continu s'evitarà que siguin arrossegats per la corrent de sortida. Els cabals a utilitzar en un fermentador continu de tanc agitat estan limitats com a resultat d'aquest fenomen, i els fermentadors tubulars amb flòculs suspesos no poden funcionar sense una aportació constant de microorganismes en la corrent d'entrada. Una resposta a això és el fermentador de llit fluïditzat, que és un híbrid entre el fermentador de tanc agitat i el fermentador tubular [35].

Una forma alternativa de fermentador tubular implica l'ús de pel·lícules microbianes mantingudes sobre superfícies apropiades situades dins el fermentador.

La massa microbiana en un fermentador pot existir en dues disposicions: suspesa lliurement o adherida a la superfície del fermentador. Els microorganismes en suspensió freqüentment s'agrupen en flòculs, amb una mida característica varies vegades major que un microorganisme senzill. Una mida determinada de flòculs són en gran majoria desconeguts però la floculació pot ser ajudada per la presència d'agents floculants (clorurs alumínics i càlcics). És raonable suggerir que tots els organismes poden presentar-se tant com cèl·lules senzilles com en grups de varies cèl·lules, tot i així, alguns

microorganismes tendeixen a formar flòculs majors que altres sota condicions ambientals aparentment idèntiques [35].

En el fermentador intermitent i el FCTA descrits anteriorment, l'eficàcia del fermentador està controlada pels microorganismes suspesos tot i que poden presentar-se en grans flòculs.

Els fermentadors tubulars depenent dels detalls de la configuració i dels cabals utilitzats, tant els flòculs com les pel·lícules poden suposar la principal contribució al rendiment.

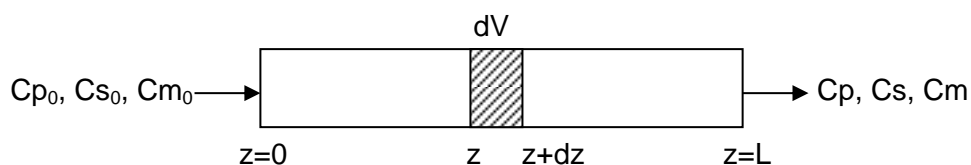
En un fermentador tubular, els organismes individuals estan exposats a diferents condicions ambientals. Això pot ser una intermitent si es relaciona la distància al llarg del fermentador tubular amb el temps en condicions intermitents [35].

En alguns fermentadors tubulars, però, les partícules són transportades amb el fluid, fet que requereix una aportació constant de microorganismes a la base del fermentador. Això es pot aconseguir amb un sistema de reciclatge que fa el procés molt més complex que en els casos anteriors [30].

Qualitativament, aquests fermentadors tubulars es poden representar suposant que el líquid circula al flux en pistó i la massa microbiana roman flotant en el medi en condicions estacionàries. Com que les diferències de densitat entre flòculs i líquid són baixes, els cabals necessaris també són baixos. Un exemple típic és la torre de fermentació destinada a la producció de cervesa [39].

Igual que en els reactors ordinaris, el balanç global a tot el reactor no és vàlid ja que les condicions no són uniformes amb la posició en el reactor. En el fermentador tubular ideal de flux en pistó, la concentració de substrat disminueix des de l'entrada fins a sortida, i la de les cèl·lules i productes augmenten. Un altre factor primordial a tenir en compte és la necessitat d'una alimentació no estèril, ja que en cas contrari no poden existir-hi microorganismes al seu interior [39].

En estat estacionari, les condicions varien amb la posició però no amb el temps. Així, fixant un element de volum suficientment petit, les condicions, i per consegüent, la velocitat, és pràcticament contant, i el balanç per la biomassa en aquest volum s'expressa de la següent manera [39]:



$$q \cdot dC_M = r_M \cdot dV \quad \text{Eq. 6.1}$$

$$\tau = \frac{V}{q} = \int_{C_{M0}}^{C_M} \frac{dC_M}{r_M} = \int_{C_{S0}}^{C_S} \frac{dC_S}{Y_{S/M} r_M} \quad \text{Eq. 6.2}$$

A continuació es descriuen amb més detall els fermentadors tubulars de cèl·lules immobilitzades següents:

-Fermentadors de pel·lícula o biofilm

-Fermentadors de partícules

Fermentadors de pel·lícula microbiana o biofilm:

Els fermentadors tubulars basats en pel·lícules microbianes fixades no tenen els problemes d'arrossegament que es presenten en els fermentadors de flocs microbians,

La disposició més convenient de les pel·lícules microbianes dins d'un fermentador és la d'una pel·lícula que creix sobre les superfícies de partícules inertes disposades com a llit fix o llit fluïditzat.

En processos asèptics, això pot aconseguir-se per forces hidrodinàmiques ajudades possiblement per la fluïdització de les partícules suspeses.

Quan les condicions d'entrada en un fermentador de pel·lícula microbiana romanen constants, el creixement microbià porta com a conseqüència el que les condicions de sortida varien amb el temps. Degut a que la velocitat de reacció és funció de l'espessor de la pel·lícula biològica.

Després d'una acumulació acceptable de microorganismes, l'espessor de la pel·lícula es manté constant, pel que s'espera que les variables de sortida assoleixin un estat estacionari.

El filtre de degoteig, s'utilitza per eliminar la matèria orgànica soluble i insoluble, i la matèria inorgànica insoluble, de les aigües residuals.

En aquests llits s'usa la recirculació per:

-Subministrar un cabdal addicional quan la quantitat d'aigua a tractar està per sota del valor mig, i així mantenir els organismes en un estat viable

-Diluir alimentacions molt concentrades

[30] [34].

Els microorganismes es disposen en forma de pel·lícula que creix sobre la superfície. El gruix de la pel·lícula es controla retirant l'excés de producció microbiana (normalment per mètodes mecànics). No presenta problemes d'arrossegament. És molt utilitzat en el tractament d'aigües residuals i rep el nom de filtre percolador o de goteig. És un llit inert sobre el qual es forma una pel·lícula microbiana i en el qual hi circula un flux descendent per gravetat mentre que l'oxigen sol fer-ho en ascendent. La seva altura varia entre 2 i 15

metres. El control del gruix de la pel·lícula el realitzen els propis microorganismes ja que a l'augmentar es creen problemes de difusió d'oxigen i els microorganismes no poden metabolitzar el substrat, perden l'adherència i acaben desprenent-se [39].

Els fermentadors de discs rotatoris són un dels molts casos particulars dels fermentadors de pel·lícula.

Fermentador de partícules: en llit fluïditzat

La indústria química utilitza reactors tant de llit fix, com de llit fluïditzat. En els reactors de llit fix, els cabals són baixos i el flux passa a través del llit per un camí tortuós o bé, per a cabals més elevats, la pèrdua de càrrega del fluid al passar a través del llit s'igualava al pes per unitat d'àrea del llit i les partícules queden suspeses en el fluid sense contacte unes amb les altres [30]. Aquesta és la situació que es mostra a la Figura 37.

En els reactors de llit fluïditzat, per altra banda, la velocitat és més elevada i provoca que les partícules siguin arrossegades fora del tub [30]. Aquesta és la situació que es mostra a la Figura 38.

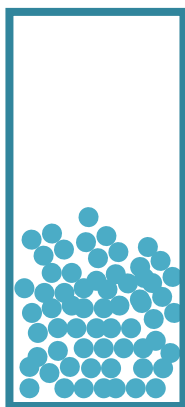


Figura 37: reactor de llit fix

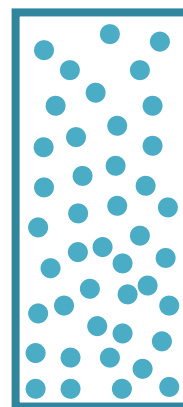


Figura 38: reactor de llit fluïditzat

A diferència de la indústria química, les partícules biològiques que s'empren en les fermentacions creixen, poden tenir una àmplia gamma de mides i tenen una densitat molt similar a la de la fase líquida. Aquests fets provoquen que al créixer, les partícules tendeixen a ajuntar-se creant un camí del flux molt irregular.

La fluïdització és una característica dels llits de partícules regulars suspeses en una corrent líquida ascendent. Si està implicada una fase gasosa addicional, les partícules tindran tendència a estar menys uniformement distribuïdes en el llit [30] [34].

Els llits amb mescles de partícules tenen dues característiques: l'increment de la porositat des del fons fins a la part superior del llit, i la disminució del moviment de les partícules com es compara amb els llits que contenen partícules de mida uniforme [30] [34].

La porositat o fracció de forats és una mesura de l'espai lliure dins d'un llit, representa també una mesura de la retenció microbiana quan s'expressa com a volum humit per unitat de volum de llit. Durant el procés, les partícules més petites ascendeixen en relació a les partícules més grans. Com les partícules més petites tenen menor velocitat de sedimentació, el llit que s'organitza de forma que les partícules més petites estiguin en la regió de porositat major i la velocitat lineal sigui menor [30] [34].

En aquestes circumstàncies els floculs individuals en el fermentador estarien associats amb les condicions ambientals que caracteritzen la posició del llit. En un fermentador en forma de torre els floculs de llevat es mantenen en suspensió pel moviment ascendent del medi i les partícules arrossegades són retornades per mitjà d'un dispositiu de sedimentació situat en la part superior de la torre [30] [34].

Un llevat floculant és capaç d'assolir mides de flocul relativament grans, és essencial per una fermentació alcohòlica en un FLF a velocitats de flux acceptables, ja que d'altra manera s'arrossegarien una gran proporció de llevat i la concentració d'aquesta seria insuficients. Una característica significativa de la torre és la caiguda progressiva i contínua en el pes específic del medi nutrient entre el fons i la part superior de la torre [30] [34].

A continuació es mostra una taula resum de diferents tipus de fermentadors amb les consegüents característiques.

Fermentador	Control de pH	Característiques d'importància industrial	Principals aplicacions industrials
BATCH	Sí	Molta mà d'obra	Major part de fermentacions industrials
CSTR	Sí	Cabal limitat per l'arrossegament	Depuració d'aigües residuals i producció de proteïnes microbianes
Tubular de pel·lícula	Difícil de controlar	Difícil control de la retenció de microorganismes dins el fermentador	Depuració d'aigües residuals, producció de vinagre
Tubular de llit fluiditzat	Difícil de controlar	Cabal limitat per l'arrossegament	Producció de sidra i cervesa

Taula 10: resum de diferents tipus de fermentadors i les seves característiques

F.6.- Fermentadors utilitzats per a la producció de BC

La síntesi de la cel·lulosa bacteriana es duu a terme tant en cultiu estàtic com en cultiu agitat, proporcionant l'aeració i l'agitació necessàries per la homogeneïtat del medi i per l'efectivitat de la transferència de massa. L'elecció de les condicions del medi de cultiu depèn estrictament de l'ús final del polímer.

El rendiment de la cel·lulosa bacteriana en cultius estàtics depèn bàsicament de la relació superfície/volum. Una relació òptima protegeix tant de l'excés (no necessari) com de la falta d'aeració. Alguns ràtios superfície/volum varien entre $2,2 \text{ cm}^{-1}$ i $0,7 \text{ cm}^{-1}$ [1].

La síntesi de cel·lulosa bacteriana en cultiu estàtic es pot dur a terme en un pas (medi inoculat amb 5-10% de suspensió cel·lular) o en dos passos. Aquest últim procediment consisteix en un cultiu agitat seguit d'un cultiu estàtic.

Krystynowicz l'any 1997 va modificar el procediment de dos passos aplicant de manera consecutiva dos cultius estàtics. La pel·lícula produïda durant les primeres 24 hores (el primer pas) va ser tallada en trossos uniformes utilitzant-la com a inòcul per començar el següent cultiu, d'una durada de 4 a 5 dies. Aquest mètode va permetre obtenir un creixement de les bactèries uniforme i unes pel·lícules homogènies.

El control de la síntesi de la cel·lulosa bacteriana en cultius estàtics és molt complexa degut a l'accés limitat de la pel·lícula al líquid del medi.

Un paràmetre important que requereix un control continu és el pH. L'acumulació d'àcids cetoglucònics al cultiu disminueix el pH per sota del valor òptim per la síntesi i el creixement dels polisacàrids. Degut a que els mètodes convencionals de mesura de pH no poden utilitzar-se en cultius estàtics, Vandamme l'any 1998 va aplicar una via de control de pH in situ, mitjançant l'optimització del disseny del medi de fermentació introduint àcid acètic com a substrat addicional per l'*Acetobacter* sp. LMG1518. Els productes de l'àcid acètic van contrarestar el decreixement del pH causat per la formació d'àcids glucònics i van proporcionar un pH constant de 5,5 durant tot el procés.

El control de la síntesi de BC es pot millorar gràcies a uns fermentadors especials. La producció de cel·lulosa en fermentadors horitzontals aporta una combinació de cultiu estàtic i cultiu agitat. El polímer es disposa a la superfície d'uns discs rotatoris que giren entorn d'un eix i part de la superfície d'aquests es submergeix al medi líquid.

Les avantatges d'aquest mètode inclouen una major superfície de polímer, la síntesi de la cel·lulosa es produeix en forma de fibres buides de diferent diàmetre i el control del procés és millor, més fàcil d'escalar, la producció de cel·lulosa és més elevada, i hi ha la possibilitat de subministrar nutrients durant el procés, entre d'altres.

Bungay i Serafica l'any 1997 van produir cel·lulosa en un fermentador amb discs rotatoris (1-L) de 12 cm de diàmetre i van descobrir que la concentració òptima de sucre (sucrosa o glucosa) era de 10 g/L, amb una rotació de 12 rpm i un pH constant de 5.0.

El mateix any, Krystynowicz va aplicar un reactor de discs 11-L que contenia 3 L de medi H-S per la síntesi de BC amb *Acetobacter Xylinum*. La rotació òptima dels 11 discs de 12 cm de diàmetre cada un va resultar ser de 3 rpm. Després de 7 dies de creixement, es van obtenir 4,2 g/L de cel·lulosa seca.

La producció de cel·lulosa bacteriana en cultius agitats requereix normalment fermentadors comuns equipats amb algunes parts estàtiques (deflectors, fulles, etc.) que permetin l'adhesió cel·lular, ja que en fase aquosa, la cel·lulosa sintetitzada sol deixar-se caure.

Per altra banda, diverses micropartícules insolubles en aigua com ara sorra, perles de vidre o terra de diatomees s'afegeixen al medi de cultiu augmentant la productivitat de la cel·lulosa bacteriana, ja que el biofilm format per la bactèria a les partícules limita la transferència d'oxigen i atura l'oxidació de la glucosa a àcid glucònic.

La producció a gran escala amb fermentadors agitats i airejats es troba amb diferents inconvenients, entre els quals l'aparició espontània de mutacions cel·lulars que contribueixen a una disminució de la producció de cel·lulosa. Una agitació i aeració òptimes eviten possibles turbulències, que tenen un efecte negatiu en la polimerització i cristallització de la cel·lulosa, reduint el rendiment del polisacàrid.

Per exemple, una agitació de 60 rpm i una aeració de 0,6 volum per volum per minut (v.v.m.), són paràmetres òptims per l'*Acetobacter Acetisp. Xylinum* ATCC 2178 cultivat en un fermentador de 300-L durant 45h a 30°C, d'on se n'obtenen 10 g BC L⁻¹d⁻¹.

Ben-Bassat l'any 1989 va investigar la producció de BC amb *Acetobacter Xylinum* 1306-21 en un fermentador Chemap de 14-L amb un medi de cultiu de CSL i glucosa amb un 2% de cada. Amb 900 rpm i un 30% de saturació d'aire (concentració d'oxigen dissolt), el rendiment del polímer va arribar fins a 5,1 g L⁻¹d⁻¹.

L'any 2000 Chao i col·laboradors van utilitzar un reactor d'airlift de 50-L per la síntesi de cel·lulosa bacteriana amb *A. Xylinum* sp. BPR2001. L'aeració amb oxigen enriquit va augmentar el rendiment de la cel·lulosa de 3,8 fins a 8 g L⁻¹d⁻¹ després de 67 h.

La producció de BC en fermentadors es troba amb problemes d'agitació similars als del cultiu de fongs o estreptomicines; com que la majoria d'aquests organismes creixen en forma de filaments o pellets, els brous de cultiu es converteixen en fluids no newtonians. Una alta concentració de miceli en forma d'una suspensió densa o partícules de formes diverses limita l'agitació i la transferència de gas. Augmentant l'agitació per aconseguir millorar la ventilació, acaba provocant un dany al producte degut a les forces de cisalla.

Bauer, l'any 1992 va considerar aquest aspecte introduint un agent protector de poliàcrilamida al medi de cultiu. Aquest protector va reduir els danys per cisallament però va afectar a la productivitat ja que el creixement cel·lular va resultar ser menor [1].

L'any 1996 Kouda va realitzar un estudi amb un agitador dins un fermentador de tang agitat en un medi amb AX, utilitzant diferents agitadors (turbina, hèlice i maxblend) obtenint la millor producció amb l'últim. Això és degut a que en un medi de cultiu no newtonià on la viscositat augmenta a mesura que es produeix la cel·lulosa, aquest tipus d'agitador facilita el transport d'oxigen i nutrients del medi al microorganisme i disminueix les zones mortes dins el reactor. Inconvenient: es requereix molta energia per mantenir la mescla, fet que incrementa els costos de producció [28].

L'acumulació d'alguns metabòlits també pot afectar a la producció de cel·lulosa. Per exemple, l'any 1998, uns estudis de Koula van revelar que una alta pressió parcial de CO₂ afecta negativament al creixement de l'*Acetobacter Xylinum* i redueix el rendiment de la cel·lulosa bacteriana [1].

Laboureur l'any 1998 va desenvolupar un mètode per a la producció de cel·lulosa bacteriana amb *Acetobacter Xylinum* sp. ATCC 21780 en uns fermentadors de 300 i 500-

L amb un medi de cultiu amb un 5% de sucrosa, 0,05% d'extracte de llevat, 0,2% d'àcid cítric, sals de nitrogen, Mg^{2+} i fosfats. El medi va ser inoculat amb un 12% d'inòcul i cultivat durant 160h. El procés es va dur a terme durant 45 h a 30°C, a un pH de 4,8 i amb una aeració de 0,6 v.v.m. La síntesi de cel·lulosa bacteriana va arribar fins als 18 g L^{-1} (10 g $L^{-1}d^{-1}$) [1].

Chao l'any 2001 va proposar una alternativa amb reactors de columna de bombolleig o airlift, on la producció és menor, però si s'utilitza aire enriquit pot arribar a ser equivalent [28].

Cheng l'any 2002 va determinar que un reactor airlift consumeix al voltant d'una sisena part de l'energia utilitzada en un tanc agitat. Al modificar el sistema d'aeració d'un reactor airlift la producció de cel·lulosa arribava a ser 3 vegades superior a l'obtinguda en reactors convencionals [28].

Seráfica l'any 2002 va crear una variant de discos de material polimèric en l'eix rotatori sobre els quals es forma la cel·lulosa. Reducció del temps de fermentació a la quarta part en relació al cultiu estàtic [28].

Per altra banda, un altre cultiu amb *Acetobacter* sp. ATCC 8303 es va fer créixer a 28°C amb un pH de 4,6 en un medi modificat que contenia un 0,28% de glucosa, 0,07% de maltosa, 0,03% de CSL i 0,03% d'extracte de llevat. L'aeració va ser de 1 v.v.m. durant les primeres 33 h i de 0,5 v.v.m. durant les últimes 12 h. El rendiment de BC en aquest cas va arribar als 13 g $L^{-1}d^{-1}$.

La preparació d'un inòcul de densitat cel·lular apropiada per a un fermentador de gran volum també pot suposar un problema, sobretot perquè les cèl·lules queden atrapades en la cel·lulosa. Per alliberar-les i augmentar-ne la densitat, Brown va aplicar un mètode per hidrolitzar la cel·lulosa de manera parcial mitjançant cel·lulases. En presència d'aquests enzims, la densitat cel·lular arribava fins a $10^8 mL^{-1}$, mentre que sense aquests el valor era de $1,12 \cdot 10^7 mL^{-1}$.

A més dels mètodes esmentats fins ara, la producció de cel·lulosa en forma de fibres buides de diferents diàmetres també s'ha provat. Aquest material podria ser útil per la producció de venes sanguínies de petits diàmetres. Les fibres buides de BC s'obtenen fent créixer la cel·lulosa a la part interna i externa d'un suport permeable a l'oxigen com ara la cel·lofana, el Tefló, la silicona o altres ceràmics [1].

2. Objectius

a) Objectiu general

L'objectiu general d'aquest treball és dissenyar un fermentador per lots, per cultiu de la bactèria *Acetobacter Xylinum* amb una producció anual de 300 Kg, entenent que aquest dimensionament correspon al d'una planta pilot.

b) Objectius particulars

1. Selecció de la bactèria adequada per a una fermentació industrial
2. Seleccionar el tipus de fermentador per a una producció de 300 Kg/any
3. Presentar un disseny del fermentador
4. Determinar el volum del fermentador necessari per a la producció establerta
5. Determinar l'agitació necessària per a la producció establerta
6. Determinar les alimentacions necessàries per a la producció establerta
7. Determinar el substrat necessari per a la producció establerta
8. Determinar els sistemes de control necessaris per implementar el fermentador
9. Determinar les mesures de seguretat necessàries per manipular el fermentador

3. Materials i equips

Al ser un treball bibliogràfic, per a la realització del mateix no s'ha utilitzat cap tipus d'instrumentació de laboratori.

Les fonts d'informació científiques i tecnològiques que s'han utilitzat en aquest procés han estat citades a la bibliografia. Aquestes fonts han estat tant llibres, com pàgines web, i sobretot articles científics on es descriuen experiments referents a la producció de cel·lulosa bacteriana.

A més, també han estat necessaris els paràmetres essencials de disseny d'enginyeria química que es cursen al llarg de la carrera.

Per al disseny del fermentador, s'ha utilitzat el programa Solidworks®.

4. Resultats

A continuació es mostren dades recollides de diferents estudis sobre la producció de la cel·lulosa bacteriana referents al subministrament d'oxigen, a la temperatura, al pH, al substrat, a l'esterilització del medi, a la creació de l'inòcul i al rentat del producte per poder decidir posteriorment les condicions òptimes pel bioreactor que es vol dissenyar.

a) SUBMINISTRAMENT D'OXIGEN

Com en qualsevol reacció de fermentació, la producció de cel·lulosa bacteriana requereix una aportació d'oxigen constant. La majoria d'estudis realitzats sobre la producció de cel·lulosa bacteriana, implementen algun sistema de subministrament d'oxigen si es tracta d'un cultiu agitat, o bé, si es tracta d'un cultiu estàtic simplement el contacte amb l'aire és suficient.

En un cultiu agitat, la productivitat depèn estrictament del creixement dels organismes productors, és per això que és essencial augmentar la densitat cel·lular. En el cas de *l'Acetobacter Xylinum*, l'espècie aeròbica productora de BC per excel·lència, el creixement depèn directament del subministrament d'oxigen al microorganisme. És per això que podem afirmar que la productivitat de cel·lulosa bacteriana depèn directament del subministrament d'oxigen. No obstant, un excés d'oxigen ha reportat caigudes de productivitat a causa de la pèrdua de substrat per la oxidació d'aquest [40].

Analitzant diferents estudis, hom observa que l'aeració es sol dur a terme amb un anell ruixador com el que es mostra en la Figura 38 o bé un plat perforat com es mostra a la Figura 39, si es tracta d'un fermentador amb un agitador comú (no és el cas si s'utilitza un airlift, ja que la pròpia agitació és produïda per l'aeració).

Wantanabe i Yamanaka van demostrar que les tensions d'oxigen afecten directament a la producció de cel·lulosa. Segons els seus estudis, tensions d'oxigen des del 10% fins al 25% augmenten la producció de cel·lulosa [25].

En un estudi realitzat per Tohru Kouda i col·laboradors, l'aeració elegida va ser de 0,5vvm (volum d'aire per volum del fermentador per minut) [40].

Tot i això, en la majoria d'estudis de producció de cel·lulosa bacteriana no es reporta la quantitat d'oxigen per airejar el sistema.

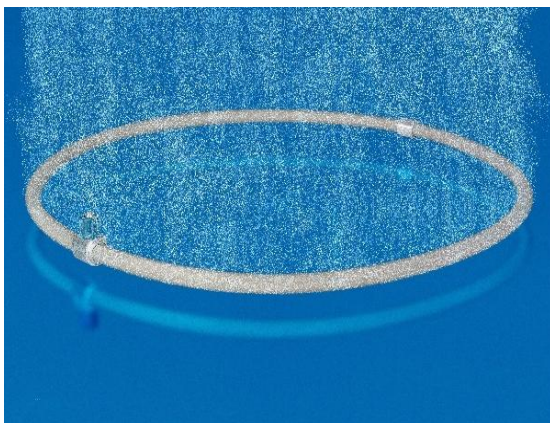


Figura 38: Anell ruixador



Figura 39: Plat perforat

b) TEMPERATURA

Pel que fa a la temperatura, la majoria d'estudis realitzats coincideixen en que el valor òptim és de 30°C. No obstant, un estudi descriu que el rang òptim pot variar dels 28°C als 30°C però hi pot haver una variació de $\pm 5^\circ\text{C}$ garantint el bon funcionament del sistema (amb valors no òptims de productivitat) [41] [42]. Altres estudis asseguren que el rang òptim de producció varia dels 25 als 30°C [25].

Per mantenir la temperatura constant, el sistema més utilitzat és una camisa d'aigua com la que es mostra a la Figura 40 [40].

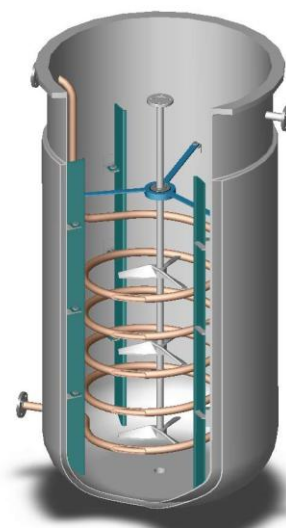


Figura 40: Reactor amb camisa

Pel que fa a l'esterilització del medi, cal assolir temperatures majors, al voltant dels 121°C, és per això que caldrà comptar amb un dispositiu que permeti assolir temperatures d'aquesta magnitud [42].

c) PH

El rang òptim de pH per a la producció de cel·lulosa amb *Gluconacetobacter Xylinus*, com s'ha comentat anteriorment, varia de d'entre 4 a 7 [25][41]. A mesura que transcorre el temps de cultiu, hi ha una disminució del pH del medi degut a la transformació dels carbohidrats en àcids acètics i de la glucosa en àcids glucònics [13]. És per això que molt autors utilitzen pH 5 o 6 per les seves investigacions, tot i que s'ha demostrat que per a la producció industrial un pH d'entre 4 i 4,5 dóna millors resultats sobretot per evitar contaminacions [25]. Amb freqüència es sol afegir fosfat de sodi o potassi per amortir els canvis de pH [28].

La majoria d'autors, doncs, ajusten el pH al voltant d'aquest rang, per exemple a valors de 5 [40], 5,9 [41] o 6 [42].

d) CREACIÓ DE L'INÒCUL I ESTERILITZACIÓ DEL MEDI

Per a crear l'inòcul, es sol fer un precultiu en un fermentador més petit on s'hi posa un petit volum del medi de cultiu i les bactèries elegides. Aquest precultiu s'esterilitza a alta temperatura i posteriorment s'introdueix al fermentador amb el medi de cultiu elegit.

En l'estudi realitzat per Angela Faustino [42], el precultiu es va dur a terme mesclant 100mL de medi HS amb l'inòcul de la bactèria *Acetobacter Xylinum* i deixant-se fermentar durant 48h a 30°C a una agitació de 150rpm. Posteriorment, per a cada medi de cultiu es van utilitzar 10^6 CFU mL (*Colony-forming Unit*) i es van omplir els plats (cultiu estàtic) amb 1mL cada un del cultiu inoculat.

Tots els medis van ser esterilitzats a 121°C durant 30min i emmagatzemats a 4°C i amb un pH =6.

Altres estudis duen a terme processos molt semblants a aquest. MitsuoTakai [41] duu a terme un procediment bastant estàndard:

- Un cep d'*Acetobacter Xylinum* proporcionat per un departament de microbiologia presentat en una suspensió de cèl·lules lliures de cel·lulosa es posen en un substrat esterilitzat
- 1mL d'aquesta solució s'inocula amb 200mL de medi líquid (HS) i es posa en un tanc agitat de 500mL
- Posteriorment aquesta solució s'incuba tant en cultiu estàtic com en cultiu agitat

Pel que fa a l'estudi de Tohru Kouda, les dades del precultiu no van ser reportades.

e) SUBSTRAT, DURADA I PRODUCCIÓ DE CADA CICLE

Tal i com s'ha vist anteriorment, hi ha una gran varietat de substrats possibles pel que fa la producció de cel·lulosa bacteriana. El substrat pot basar-se en el clàssic medi de Scharmm i Hestrin o bé es pot innovar i abaratir els costos del producte i de l'impacte ambiental del procés utilitzant fruita en estat de descomposició, entre d'altres.

Així doncs, la font de carboni més utilitzada fins al moment és la glucosa [28]. Tot i així, hi ha estudis que demostren que el rendiment augmenta si s'utilitza arabitol o mannitol en comptes de la glucosa i a més, aquests dos alcohols permeten que el pH es mantingui més estable durant la fermentació [18].

Una altre font de carboni utilitzada per Keshk és la melassa de remolatxa, on la producció també s'incrementa en comparació amb la glucosa [28].

Alguns estudis també han demostrat que utilitzant concentracions de glucosa més baixes, la producció de cel·lulosa pot arribar a augmentar fins 0,6 g/g de cel·lulosa/dia després de 2 a 4 dies de cultiu. En la majoria d'estudis publicats, la productivitat de la cel·lulosa utilitzant glucosa o fructosa és menor i oscil·la entre 0,02 g/g de glucosa/dia i 0,07 g/g de glucosa/dia [25].

Temps de fermentació: en la majoria de casos és de 4 a 10 dies [25].

A part de les fonts de carboni esmentades (glucosa, mannitol, arabitol i melassa), també s'utilitzen la sacarosa, la fructosa, la lactosa i fins i tot s'ha demostrat la capacitat de la bactèria per sintetitzar l'àcid làctic o l'àcid succínic [28].

Kurosumi compara l'ús de diferents suc de fruita en un medi H-S amb glucosa i sacarosa com a font de carboni, i els suc de fruita sense cap component addicional, només ajustant el pH inicial. La major producció es va donar en el primer cas, ja que les fonts de nitrogen del medi H-S i els compostos addicionals de les fruites afavoreixen el creixement dels microorganismes [28].

Jung i col·laboradors van realitzar un procés amb glicerol com a font de carboni en cultiu agitat i van descobrir que la producció de cel·lulosa resultava ser un 91% major en comparació amb la glucosa, resultat similar a l'obtingut per Dudman en cultiu estàtic. A més, es reduïa la producció d'àcid glicèric [28].

Un altre compost estimulador de la síntesi de cel·lulosa ha resultat ser l'etanol. L'etanol es considera una font addicional de carboni, ja que contribueix a la generació de trifosfat d'adenosina, i d'aquesta manera es millora la productivitat de la cel·lulosa. A més, també contribueix a l'eliminació espontània de les bactèries no productores de cel·lulosa. Tot i així, es considera que no és un substrat de la síntesi de cel·lulosa, sinó una font d'energia addicional [13] [18].

Altres medis de cultiu econòmics i aptes per a la producció a gran escala són les restes d'agricultura. Alguns estudis han demostrat que, per exemple, les restes de cervesa, les pells de raïm o de pinya, etc. Són unes fonts de carboni beneficioses per a la producció

de cel·lulosa bacteriana. Aquestes fonts de carboni, que per algunes indústries són un residu, generen un impacte ambiental positiu [29].

A continuació es mostra una taula resum amb les diferents fonts de carboni utilitzades al llarg dels anys per a la producció de cel·lulosa bacteriana:

FONT DE CARBONI	COMENTARIS
Glucosa	És la més utilitzada i se'n coneix bé el rendiment. Substrat HS
Mannitol o Arabitol	Millor rendiment que la glucosa, manté el pH més constant però se'n tenen poques dades respecte a la producció
Melassa de remolatxa	Millor rendiment que la glucosa, però se'n tenen poques dades respecte a la producció
Sacarosa, fructosa, lactosa	Rendiments inferiors a la glucosa
Sucs de fruita	Rendiments inferiors a la glucosa, però millora l'impacte ambiental
Glicerol	Millor rendiment que la glucosa, però se'n tenen poques dades respecte a la producció
Etanol	Font de carboni addicional que millora el rendiment i ajuda a eliminar l'aparició de bactèries no productores de cel·lulosa
Restes d'agricultura	El rendiment és inferior al de la glucosa, però l'impacte ambiental és quantiosament superior. Se'n tenen poques dades de producció. Normalment es combinen les restes d'agricultura amb un medi HS

Taula 11: Resum de les possibles fonts de carboni

Pel que fa a les fonts de nitrogen, la majoria de treballs d'investigació utilitzen el medi de cultiu H-S que conté com a font de nitrogen extracte de llevat i peptona en un percentatge del 0,5 de cada [25].

No obstant, diferents grups de recerca han alterat aquests percentatges i han buscat fonts de nitrogen alternatives per obtenir un millor rendiment en la producció.

Diferents estudis demostren que el CSL és una font molt més efectiva que la del medi H-S sobretot en cultius agitats [25].

S'han provat altres fonts de nitrogen com ara la polipeptona, triptona, el sulfat d'amoni, la caseïna i el glutamat sòdic, però cap d'aquestes ha donat els resultats del CSL [13] [28].

Per altra banda, hi ha altres components que es poden afegir al substrat que augmenten la productivitat de BC. Un d'aquests és el lactat, que augmenta la producció fins a un 22% i sovint s'utilitza en cultius agitats [28].

Un altre factor a tenir en compte és l'addició de polisacàrids al medi de cultiu. Aquesta condueix a una disminució dels esforços tallants dins del reactor i es redueix el risc de mutació de les cèl·lules productores de cel·lulosa a cèl·lules no productores [25].

La producció de cel·lulosa també depèn de la relació superfície/volum del bioreactor; un ràtio de s/v de $2,2\text{cm}^{-1}$ dona els millors resultats en quant a la producció [25].

Per altra banda, Matsuoka va demostrar que la metionina tenia un efecte important en el creixement de la cèl·lula i la producció de cel·lulosa augmentava un 90%.

També s'ha descobert que certes vitamines com l'àcid nicotínic, l'àcid p-aminobenzoic i la piridoxina tenen un paper important en el creixement cel·lular [25].

A continuació es mostra una taula resum amb les diferents fonts de nitrogen i additius:

FONT DE NITROGEN	COMENTARIS
Extracte de llevat i peptona	És el medi HS, i per tant s'en coneixen les proporcions adequades (0,5% de cada)
CSL	Estudis reporten que augmenta la productivitat, però no queda clara la proporció adequada que cal posar-hi
ADDITIUS	COMENTARIS
Lactat	Augmenta la producció fins a un 22%
Polisacàrids	Disminueixen els esforços tallants
Àcid nicotínic, àcid p-aminobenzoic, piridoxina	Aquestes vitamines ajuden al creixement cel·lular

Taula 12: Resum de les possibles fonts de Nitrogen i additius

Pel que fa a la durada dels cicles, aquests depenen del sistema de cultiu. En cultius agitats van de 24 a 72 hores mentre que en cultiu estàtic el període oscil·la entre 1 i 2 setmanes. [28]

Pel que respecte a la productivitat de la BC, aquesta depèn del medi que es faci servir. En aquest cas, les dades obtingudes es basaran en els estudis realitzats per Tohru Kouda [40] (estudi realitzat amb un medi HS clàssic) i Angela Faustino [42] (estudi realitzat amb restes d'agricultura amb medi HS).

L'estudi de Tohru Kouda (veure Annex II) es va realitzar amb les següents condicions:

- Bactèria: *Acetabacter Xylinum subsp. sucrofermentans*
- Volum nominal del bioreactor: 30 L
- Cultiu agitat
- Temps de fermentació: 72h
- La productivitat va oscil·lar entre 5 i 20 g/L
- pH=5.0
- T^a=30°C
- Cabal de gas: 0,5vvm
- Medi de cultiu; CSL-Fru

COMPONENT	QUANTITAT
Fructosa	70g/L
CSL	40mL/L
KH ₂ PO ₄	1g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,6mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5mg/L
Na ₂ MoO ₂ · 2H ₂ O	2,4mg/L
Inositol	2mg/L
Àcid nicotínic	0,4mg/L
Piridoxina·HCl	0,4mg/L
Tiamina·HCl	0,4mg/L
Sal càlcica d'àcid pantotènic	0,2mg/L
Riboflavina	0,2mg/L
Àcid p-aminobenzoic	0,2mg/L
Àcid fòlic	0,002mg/L
Biotina	0,002mg/L
Agent antiespumant (KM-72,	0,5mL/L

polímer Shinetu, Tokyo)

Taula 13: Medi de cultiu utilitzat per Tohru Kouda

L'estudi d'Àngela Faustino (veure Annex I) es va realitzar amb les següents condicions:

Aquest estudi va comparar diferents medis de cultius amb el rendiment i la productivitat de BC obtingudes. Els medis utilitzats van ser el clàssic HS, un medi basat en sèrum de llet, un medi basat en fruita en descomposició i tres medis més basats en diferents proporcions de sèrum de llet i fruites en descomposició.

Per obtenir el medi de cultiu basat en fruites en estat de descomposició, 250g de fruita es van processar amb 400mL d'aigua desionitzada en un blender. Després els suc es van filtrar i centrifugar a 4000g durant 20min.

Tots els medis van ser esterilitzats a 121°C durant 30min i emmagatzemats a 4°C i amb un pH =6.

Medi HS:

COMPONENT	QUANTITAT
Glucosa	20g/L
Peptona	5g/L
Extracte de llevat	5g/L
Fosfat sòdic anhidre	2,7g/L
Àcid cítric mono hidratat	1,15g/L

Taula 14: Medi de cultiu HS utilitzat per Angela Faustino

Medi basat en fruites i/o sèrum de llet:

COMPONENT
Mores, raïm, pinyes i pomes recol·lectades d'un mercat
Sèrum de llet obtingut d'una indústria local

Taula 15: Medi de cultiu de fruites utilitzat per Angela Faustino

A continuació (Figura 41) es mostren les característiques dels diferents medis de cultiu estudiats en funció del percentatge de fruita, sèrum de llet o medi HS i la corresponent relació C:N (massa de carboni/massa de nitrogen):

Culture media	Milk whey (%)	Rotten fruit (%)	HS (%)	C/N
M ₀	–	–	80	6.9
M ₁	80	–	–	17.7
M ₂	–	80	–	57.6
M ₃	30	60	–	35.6
M ₄	50	40	–	24.2
M ₅	30	50	–	27.5

Figura 41: Característiques dels diferents medis de cultiu

A la gràfica següent (Figura 42) es mostren els resultats de l'estudi; a l'eix y, el rendiment de la BC en mg/L. A l'eix x, els diferents medis de cultiu (M₀, M₁, M₂, M₃, M₄ i M₅) i la durada de la fermentació en hores.

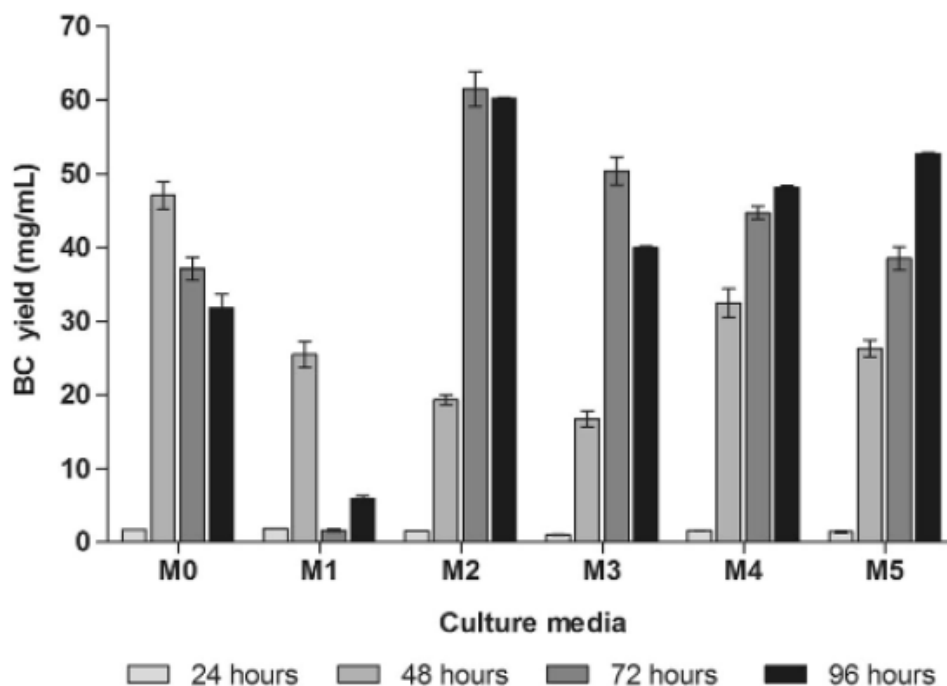


Figura 42: Resultats de l'estudi

Tal i com es mostra en aquesta gràfica, per al medi HS, el temps òptim de fermentació són 48 h. El mateix passa amb el medi basat en sèrum de llet.

El medi basat únicament en fruites va resultar ser el de més elevat rendiment i productivitat. Tal i com es mostra a la gràfica, no hi ha diferència entre les 72 i les 96h (veure barra d'error) i el rendiment va ser de 60,2 mg/mL. La productivitat va resultar ser de 0,63 mg/mL·h.

Aquest estudi defineix els paràmetres cinètics de rendiment i productivitat com:

$$Y_{P/S}=(dS/dT)/(dP_{BC}/dt) \quad \text{Eq. 7.1}$$

$$P_{BC}=C_{BC}/t \quad \text{Eq. 7.2}$$

f) RENTAT DEL PRODUCTE

Pel que fa al rentat del producte, cada estudi en fa petites variacions però tots consten d'un rentat amb aigua i NaOH i una posterior centrifugació i/o assecat.

L'estudi d'Angela Faustino procedeix de la següent manera:

El medi de cultiu va ser diluït amb 3 parts d'aigua per cada part de medi de cultiu, escalfat posteriorment a 80°C durant 20 minuts i centrifugat per eliminar els components residuals. Posteriorment, el precipitat es va rentar amb 3 parts d'NaOH a 0,1M per cada part de producte per dissoldre els components cel·lulars i posteriorment rentat diverses vegades amb aigua desionitzada.

L'estudi de Tohru Kouda procedeix de la següent manera:

La cel·lulosa produïda es va esbandir en aigua destil·lada i posteriorment es va submergir en NaOH 1M a 60°C durant 90min per eliminar les cèl·lules que poguessin quedar. Després la BC es va rentar amb aigua destil·lada i assecats 50°C durant 24h.

Selecció de les condicions òptimes

En base als valors d'oxigen, temperatura, pH, substrat, durada i producció de cada cicle, creació de l'inòcul, esterilització del medi i rentat del producte reportats per altres investigadors, es decideix operar en les següents condicions:

a) OXIGEN DISSÒLT

La font que indica la quantitat d'oxigen és l'estudi realitzat per Tohru Kouda i col·laboradors, on l'aeració elegida va ser de 0,5vvm. Així doncs, s'ha decidit prendre aquesta dada pel fermentador.

b) TEMPERATURA

S'ha escollit una temperatura de 30°C, ja que tots els estudis inclouen aquest valor dins els rangs proposats i la majoria coincideix en que és el valor òptim per dur a terme la fermentació. Una petita variació d'aquest valor, no afectarà notablement al rendiment.

c) PH

Pel que fa al pH del sistema, la millor opció per a produccions industrials és propera a 4, mentre que per temes de corrosió l'òptim és el pH més bàsic possible (rondant els 6). És per això, que s'ha elegit treballar a pH=5.

d) CREACIÓ DE L'INÒCUL I ESTERILITZACIÓ DEL MEDI

En base als estudis realitzats, per a la creació de l'inòcul es procedirà de la manera següent:

- Comprar un cep d'*Acetobacter Xylinum subsp. Sucrofermentans*
- Aquest cep es pot replicar a la mateixa planta per no haver de comprar ceps nous cada vegada que calgui fer inòcul, tenint en compte que tenen una vida útil limitada, ja que acaben mutant
- 1mL d'aquest cep s'inocularà amb 200mL de medi HS i s'agitarà en un tanc de 500mL durant 48h a 30°C amb una agitació de 150 rpm
- El medi de cultiu final s'inocularà amb 10^6 CFU per cada litre de substrat
- L'inòcul pot ser emmagatzemat a 4°C després d'haver estat esterilitzat

Tots els medis seran esterilitzats abans d'entrar al bioreactor a 121°C durant 30 minuts.

e) SUBSTRAT, DURADA I PRODUCCIÓ DE CADA CICLE

Arribat a aquest punt, és necessari decidir quin substrat és el més adequat pel fermentador que es vol dissenyar. Des d'un inici, aquest treball té com a base la reducció de l'impacte ambiental, tant per a la producció de bioplàstics que se'n pugui fer de l'ús de la cel·lulosa com en totes les parts que componen el mateix estudi. És per això que s'ha decidit triar com a substrat restes d'agricultura com les que es descriuen a l'estudi esmentat anteriorment, amb l'afegit que, segons demostra la mateixa investigació, el rendiment i la producció de la cel·lulosa augmenten en comparació al medi HS.

Havent vist també que certs additius augmenten notablement la producció de cel·lulosa, i en base a l'estudi de Tohru Kouda, s'ha decidit afegir al medi de cultiu els següents additius amb la següent concentració:

- Àcid nicotínic: 0,4 mg/L
- Piridoxina: 0,4 mg/L
- Àcid p-aminobenzoic: 0,2 mg/L
- Agent antiespumant KM-72: 0,5mL/L

Per tant, la base del substrat serà el suc de fruita que s'obté de mesclar aigua desionitzada amb fruites malmeses en un blender del volum pertinent amb una filtració i centrifugació posterior d'una durada de 20min. Seguidament s'afegiran els additius esmentats i l'inòcul per introduir la mescla al bioreactor.

Pel que fa a la productivitat, ha calgut estimar-la en base a l'estudi de Tohru Kouda, ja que al tractar-se d'un cultiu agitat la fiabilitat és major.

Aquest estudi reporta dades de productivitat que oscil·len entre 5 i 20 g/L. Tenint en compte que s'han afegit certs additius i que el medi de fruites en l'estudi d'Àngela Faustino és el més productiu, s'estima que la productivitat amb el substrat escollit serà de 20 g/L.

La durada del cicle també s'ha estimat en base als dos estudis esmentats. Tenint en compte que en el cas del cultiu agitat la fermentació òptima durava 72h i que en el cultiu estàtic que utilitza el medi de fruites en estat de descomposició l'òptim no es diferenciava entre 72 i 96 hores, s'ha estimat una durada del cicle òptima de 72h.

f) RENTAT DEL PRODUCTE

El producte es submergirà en una dissolució 1M d'NaOH a 60°C durant 90 minuts per eliminar-ne les cèl·lules i posteriorment s'esbandirà amb aigua destil·lada (3 parts d'aigua per cada part de volum de producte). Després es filtrarà i s'assecarà a 50°C durant 24h.

A continuació (Figura 43) es mostra un diagrama resum.

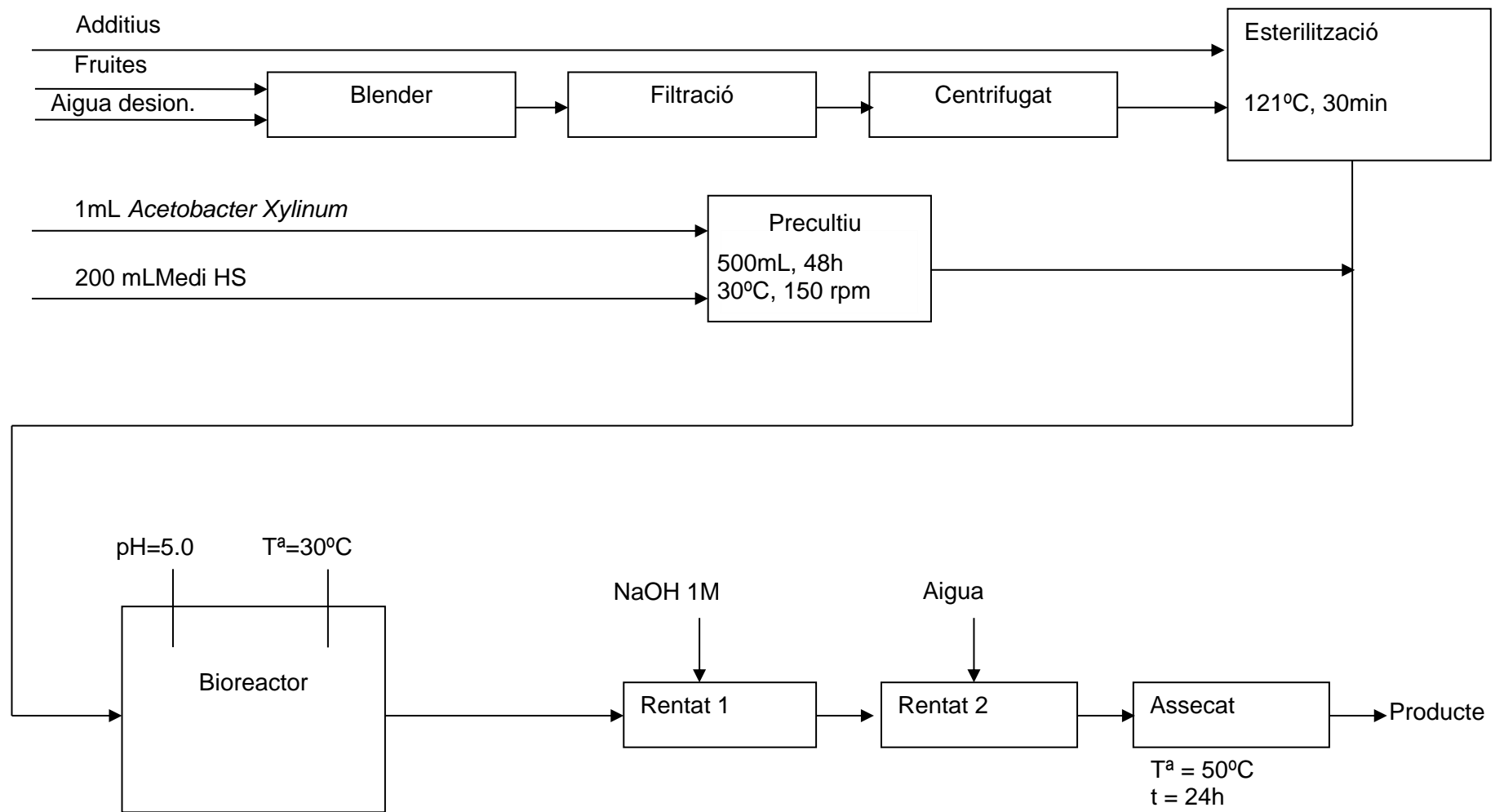


Figura 43: Diagrama del procés

Equacions involucrades

a) CINÈTICA DE LA REACCIÓ [43] [44]

El creixement microbià és l'increment de les cèl·lules o l'augment de la biomassa. Aquest creixement es pot modelar matemàticament per preveure l'augment de la població en un cultiu microbià, i d'aquest model en depèn el disseny del bioreactor.

Els microorganismes presenten un creixement catalític que es pot descriure seguint el següent model matemàtic:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{Eq. 8}$$

On x és la concentració cel·lular, μ és la velocitat específica de creixement i t és el temps de creixement. Aquesta equació diferencial, es representa gràficament com:

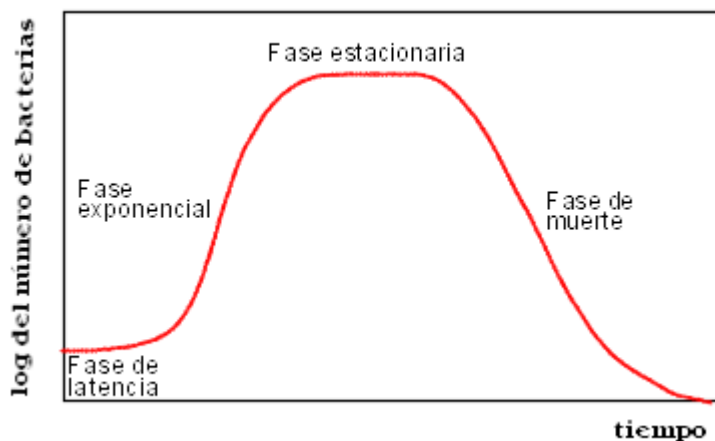


Figura 44: Fases del creixement microbià

Fase de creixement cel·lular o fase de latència:

És una fase d'adaptació on no hi ha creixement microbià, tot i que el metabolisme està actiu. S'assimila el medi de cultiu i es processa segons les necessitats nutricionals.

Fase exponencial:

En aquesta fase hi ha duplicació cel·lular de manera accelerada. Al temps en que una cèl·lula es duplica se'l coneix com temps de duplicació o regeneració.

Fase estacionària:

En aquesta fase, la velocitat de divisió cel·lular decreix fins al punt que les noves cèl·lules són produïdes al mateix ritme que moren les cèl·lules velles, i per tant el número de cèl·lules és constant.

Fase de mort cel·lular:

En aquesta etapa ja no és possible la divisió cel·lular, i per tant les cèl·lules moren i la població decreix exponencialment en unes condicions no representades matemàticament a l'equació 8.

Així doncs, el terme μ fa referència a la velocitat específica de creixement cel·lular i és la relació de creixement de la cèl·lula en funció dels nutrients del medi.

Aquesta variable s'obté amb la següent equació de Monod:

Substrat (S) + cèl·lules (X) \rightarrow cèl·lules (X) + producte (P)

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Eq. 9}$$

On:

- S és la concentració del substrat limitant
- μ_{max} és la constant de velocitat màxima de creixement
- K_s és la constant de Monod; valor de la concentració del nutrient limitant a la que la velocitat específica de creixement és la meitat de la màxima
- X: concentració de les cèl·lules
- P: concentració de producte

Per a valors de S inferiors a K_s , la velocitat de creixement és funció d'una forma lineal de S, mentre que per a valors superiors, deixa de dependre'n.

La velocitat de creixement de les cèl·lules és un procés que es produeix en paral·lel al consum del substrat i a l'obtenció del producte.

La relació entre aquests tres processos no sempre segueix una mateixa pauta, sinó que depèn de cada tipus de microorganisme.

De manera general, Gaden estableix una classificació que es basa en tres tipus diferenciats de sistemes:

Tipus 1: Productes associats al creixement. La formació de producte és funció del consum de substrat i en gran mesura és proporcional a la mateixa.

Tipus 2: Productes parcialment associats al creixement. La formació de producte depèn només indirectament del consum del substrat.

Tipus 3: Productes no associats al creixement. La formació del producte no depèn del consum del substrat.

Les expressions de la velocitat de formació de productes per cada un d'aquests sistemes es basa en l'equació proposta per Luedeking i Piret:

$$r_P = \alpha \cdot r_X + \beta \cdot X = \alpha \cdot \beta \cdot X + \beta \cdot X \quad \text{Eq. 10}$$

A partir d'aquesta equació, es pot apreciar que la velocitat de formació del producte depèn de dos termes; un associat al creixement ($\alpha \cdot \beta \cdot X$) i un altre associat a la concentració de cèl·lules ($\beta \cdot X$). Per tant, per a una fermentació del tipus 1, com és el cas de la cel·lulosa bacteriana tal i com s'ha vist anteriorment, l'expressió es redueix a $r_P = \alpha \cdot r_X$.

En aquest cas, el paràmetre α coincideix amb la definició de rendiment; producte/cèl·lules o $Y_{P/X}$.

L'equació de Monod s'utilitza com a paràmetre de disseny dels bioreactors ja que és l'equació que s'assembla més al comportament poblacional de microorganismes i que depèn de la quantitat de substrat que conté el bioreactor.

En cas que l'equació de la velocitat de creixement es trobi en un sistema Batch, i depengui a la vegada de la concentració del substrat, s'ha d'introduir el concepte de rendiment de la reacció entenent-se com:

$$Y = -dx/dS \quad \text{Eq. 11.1}$$

Fent les substitucions i modificacions pertinents, l'equació final és la següent:

$$\frac{YS_0 + Yk_S + x_0}{YS_0 + x_0} \ln\left(\frac{x_1}{x_0}\right) + \frac{Yk_S}{YS_0 + x_0} \ln\left(\frac{YS_0}{YS_0 + x_0 - x_1}\right) = \mu_{m\acute{a}x} t \quad \text{Eq. 11.2}$$

Aquesta equació és una variant de l'equació de Monod per a sistemes que depenen directament de la concentració del substrat.

L'equació de Monod descriu el creixement cel·lular. Si observem aquesta equació des del punt de vista cinètic, adopta la forma següent (aquesta equació és l'equació de Monod (11.1) integrada):

$$r_x = dX/dt = \mu_m S \cdot X / (K_s + S) \quad \text{Eq. 11.3}$$

On r_x és la velocitat de creixement de les cèl·lules.

Amb aquesta forma de l'equació es dissenyen les corbes de creixement òptimes en Bioreactors.

b) CAPACITAT DE PRODUCCIÓ

L'objectiu principal d'aquest treball estableix una producció de 300 Kg/any, és a dir, una producció corresponent a la d'una planta pilot.

Si s'estableix que el reactor treballa 40 setmanes l'any, és a dir, 280 dies l'any dedicant la resta de dies a la neteja i manteniment dels equips, es pot obtenir la quantitat de producte que cal obtenir de manera setmanal. S'ha establert que el cicle de treball 72h (3 dies), per tant, la quantitat de producte setmanal és la següent:

$$P_{\text{setmanal}} = \frac{300 \text{ Kg}}{1 \text{ any}} \cdot \frac{1 \text{ any}}{280 \text{ dies}} \cdot \frac{7 \text{ dies}}{1 \text{ setmana}} = 7,5 \text{ Kg de BC/setmana} \quad \text{Eq. 12.1}$$

Per tant, els kilograms que cal obtenir en cada cicle (3 dies) de treball son:

$$P_{\text{cicle}} = \frac{7,5 \text{ Kg}}{1 \text{ setmana}} \cdot \frac{1 \text{ setmana}}{7 \text{ dies}} \cdot \frac{3 \text{ dies}}{1 \text{ cicle}} = 3,21 \text{ Kg de BC/cicle} \quad \text{Eq. 12.2}$$

Sabent que la producció esperada pel medi de cultiu triat és de 20 g/L es pot estimar el volum de substrat que ha de tenir cada cicle, i en conseqüència el volum que ha de tenir el reactor.

c) VOLUM DEL FERMENTADOR NECESSARI PER A LA PRODUCCIÓ ESTABLERTA

Tenint en compte que el volum útil d'un bioreactor és aproximadament un 70% del volum real, i si s'estableix que per a un reactor BATCH de configuració vertical el diàmetre sol ser 2/3 de l'altura, s'han calculat les dimensions del bioreactor com:

$$V_{\text{substrat}} = \frac{3,21 \text{ Kg BC}}{1 \text{ cicle}} \cdot \frac{1 \text{ L substrat}}{0,02 \text{ Kg BC}} = 160,5 \text{ L de substrat/cicle} \quad \text{Eq. 12.3}$$

$$V_{\text{substrat}} = 70\% \cdot V_{\text{final}} \quad \text{Eq. 12.4}$$

$$V_{\text{final}} = \frac{160,5 \text{ L}}{0,7} = 229,28 \text{ L} = 250 \text{ L} \quad \text{Eq. 12.5}$$

Tenint en compte que el volum de substrat necessari és de 160,5 L per cada cicle, es pot calcular la quantitat de fruites (l'estudi d'Àngela Faustino utilitza mores, pinyes, raïm i pomes) que seran necessàries per cada cicle del reactor.

La mescla inicial de restes de fruita es barreja en un blender amb una quantitat equivalent de 1,6 mL d'aigua per cada gram de fruita.

La mescla utilitzada en l'estudi de referència és de 250 g de fruites i 400 mL d'aigua.

En aquest cas, cal calcular els mL totals de la mescla resultant per poder escalar el valor als 160,5 L de substrat necessaris. Cal mencionar que en el càlcul del rendiment entès com l'absorció dels polisacàrids per la bactèria no es computaran els additius afegits, ja que no són assimilats per la bactèria. Per facilitar els càlculs s'ha despreciat del volum total la quantitat d'additius, ja que representa un percentatge del total molt baix.

Es pren com a valor una quantitat a parts iguals dels 4 tipus de fruites presents en el substrat.

- 400 mL d'aigua
- 62,5 g de mora
- 62,5 g de pinya
- 62,5 g de raïm
- 62,5 g de poma

La densitat de les següents fruites es troba a la taula 16.

FRUITA	DENSITAT	VOLUM EN 62,5 g
Mora	965,25 mL / 1000 g	60,32 mL
Pinya	946,07 mL / 1000 g	59,12 mL
Raïm	950,57 mL / 1000 g	59,41 mL
Poma	1000 mL / 1000 g	62,5 mL

Volum total de fruites	241,35 mL
-------------------------------	------------------

Taula 16: densitat de les fruites utilitzades com a substrat

Per tant, la quantitat total de substrat a base de restes de fruites i aigua és de:

$$V_{\text{suc de fruita}} = 241,35 \text{ mL} + 400 \text{ mL} = 641,35 \text{ mL de mescla.}$$

Escalant els valors, la quantitat d'aigua i fruita que cal mesclar per obtenir el substrat necessari per a un cicle del reactor és de:

- 87,76 L de fruita
- 145,45 L d'aigua

A través de la densitat, i tenint en compte que un 10% de la fruita serà desestimada després de la filtració (la pell, pinyols, etc), els grams de fruita necessaris (prenent un volum de 21,94 L de cada fruita) és de:

- Mora: 22,72 Kg + 10% = 25,0 Kg
- Pinya: 23,19 Kg + 10% = 25,5 Kg
- Raïm: 23,08 Kg + 10% = 25,4 Kg
- Poma: 21,94 Kg + 10% = 24,134 Kg

Tot i això, es poden triar altres fruites en funció de la temporada i dels residus de fruita disponibles, ja que aquestes quantitats són fàcilment recalculables i no variaran excessivament, ja que totes les fruites tenen una densitat molt similar.

Així doncs, s'estableix un volum del bioreactor de 250 L. El reactor consta d'una part cilíndrica i d'una cúpula semiesfèrica al final. Així doncs;

$$V_{\text{cilindre}} = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot h = \mathbf{250 \text{ L}} = 0,25 \text{ m}^3 \quad \text{Eq. 12.6}$$

$$D = 2/3 h$$

$$V_{\text{cúpula}} = \frac{1}{3} \pi a^2 (3r - a) \quad \text{Eq. 12.7}$$

On a és l'alçada de la cúpula i r el radi.
S'ha establert una alçada de la cúpula de a=12cm=0,12m

$$V_{\text{reactor}} = 0,25 \text{ m}^3 = \frac{\pi}{4} \cdot \left(\frac{2}{3}h\right)^2 \cdot h + \frac{1}{3} \pi (0,12)^2 (h - 0,12) \quad \text{Eq. 12.8}$$

$$h = 0,90 \text{ m} = 90 \text{ cm}$$
$$D = 0,60 \text{ m} = 60 \text{ cm}$$

Disseny del fermentador

a) Condicions essencials d'operació

A l'hora d'escollir quin tipus de cultiu era el més adequat per a la producció preestablerta de 300 Kg/any, s'ha decidit triar el cultiu agitat, ja que els estudis realitzats puntualitzen que la producció a nivell industrial és rendible utilitzant aquesta opció. Cal esmentar que les aplicacions finals del producte seran específiques ja que amb aquest mètode s'obté la cel·lulosa en forma de pellets i per tant, no s'obté en forma de biofilm, producte del qual se'n deriven certes aplicacions mèdiques esmentades anteriorment.

La bactèria elegida és *l'Acetobacter Xylinum* (o *Gluconacetobacter Xylinum*) subespècie *sucrofermentans*, ja que és la bactèria que reporta rendiments més elevats per a la producció de cel·lulosa bacteriana.

b) Parts essencials del fermentador

- **Vas**

El reactor elegit és un fermentador discontinu de tanc agitat. La geometria d'aquests reactors és cilíndrica i les dimensions del vas tal i com s'ha vist en l'apartat anterior són:

$$h = 90 \text{ cm}$$
$$D = 60 \text{ cm}$$

Aquest vas constarà de 4 peus a mode de suport per elevar-lo a certa altura. El material triat pel vas és un acer inoxidable del tipus A316L, ja que és un material comú entre els bioreactors, econòmic, fàcil de netejar i resistent a la corrosió.

- **Canonades d'alimentació: determinar les alimentacions necessàries**

El bioreactor tindrà dues canonades per entrar-hi l'alimentació. Una d'aquestes es destinarà exclusivament a la mescla provinent del prefermentador i l'altre a

la mescla provinent de l'esterilització, que conté el substrat i els additius. Els dos ports es situaran a la tapa superior del vas. S'afegiran dos ports més per si algun dia fossin necessaris (per afegir addicions, correctors de pH o altres), i altres ports més petits poder introduir-hi sondes.

Totes les canonades del sistema seran d'acer inoxidable per les bones propietats envers la corrosió i per comoditat i economia.

- **Canonades de sortida**

A la tapa inferior del vas hi haurà una canonada de la sortida del producte final, d'aquesta manera el producte baixa per efecte de la gravetat i no cal bombejar-lo.

- **Vàlvules de control a l'entrada i a la sortida**

Tant les alimentacions d'entrada com la sortida del producte han de constatar de vàlvules per regular-ne el cabal. S'han escollit vàlvules de bola ja que són senzilles, barates i compleixen els requisits necessaris per al bioreactor de mida planta pilot.

No s'ha cregut necessari l'ús d'un actuator, ja que incrementaria el preu i al ser una escala pilot amb el control manual és suficient.



Figura 45: Vàlvula de bola de la marca BAC VALVES S.A.

- **Agitador i motor**

El sistema d'agitació és dels punts més rellevants en el disseny del bioreactor, ja que d'aquest sistema en depèn la homogeneïtat de la mescla en tots els punts del vas. Cal tenir en compte que la producció de cel·lulosa bacteriana no és una fermentació estàndard, ja que a mesura que es va creant el producte, el fluid passa en un estat no newtonià de manera gradual.

Segons l'estudi de Tohrú Kouda, que comparava diferents tipus d'agitació amb la producció final de BC, els agitadors més adequats van resultar ser els Maxblend i les portes amb impulsors de turbina. En la Figura 46 es mostren els diferents agitadors que van contemplar la investigació.

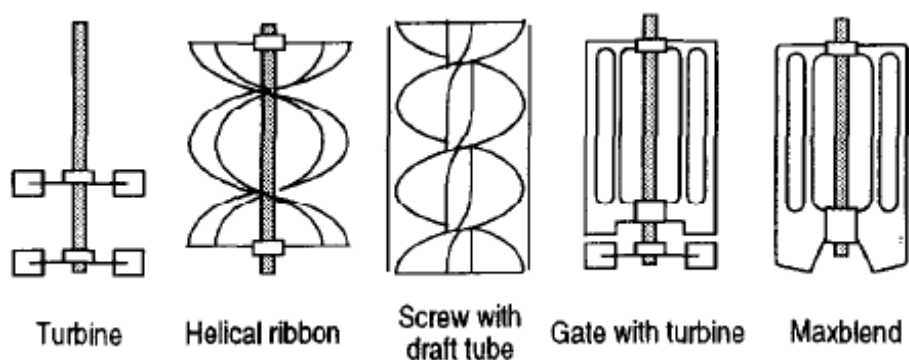


Figura 46: Agitadors estudiats per Tohrú Kouda



Figura 46: Reactor amb agitador tipus Maxblend

S'ha decidit utilitzar un sistema d'agitació Maxblend de les mateixes dimensions (escalades) que les de l'estudi de Tohru Kouda:

h = distància entre la base del vas i l'impulsor = 5 mm

L = amplada de l'impulsor = 145 mm

ds = diàmetre de l'anell o plat ruixador = 70 mm

El fermentador utilitzat era de **130 mm de diàmetre**. Escalant les dimensions per a un fermentador de **600 mm de diàmetre**, els valors obtinguts són els següents (els valors s'han arrodonit a la unitat):

h = distància entre la base del vas i l'impulsor = 23 mm

L = amplada de l'impulsor = 670 mm

ds = diàmetre de l'anell o plat ruixador = 323 mm

Esquema de l'agitador:

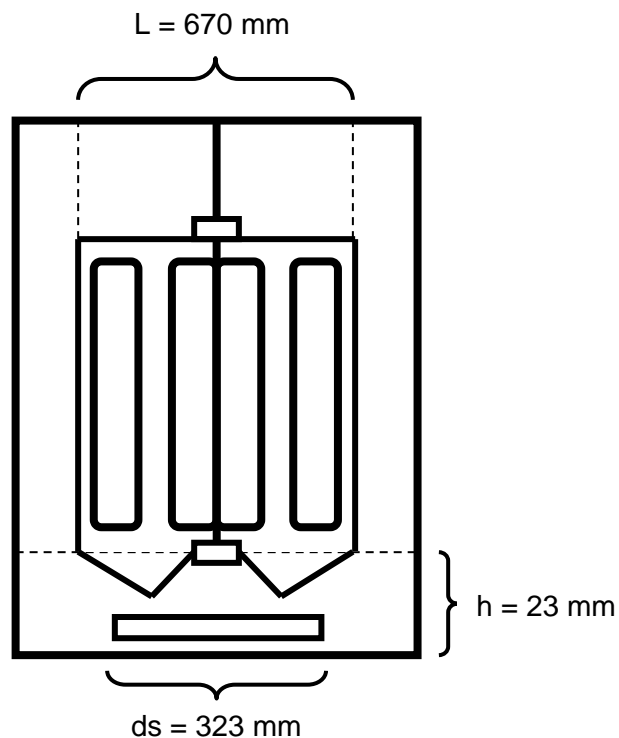


Figura 47: Esquema de l'agitació tipus Maxblend

Pel que fa a la potència, l'estudi de Tohru Kouda estableix un valor d' $1W/L$ en el cas del Maxblend. Per tant, en un fermentador de 250 L amb un volum de

substrat de 160,5 L, la potència del motor serà de **200 W** per tenir un cert marge i arrodonir el valor.

El material de l'agitador serà també acer inoxidable.

- **Sistema de control de pH (pH-metre)**

A la tapa del fermentador hi haurà una entrada per un sistema de control de pH. S'ha escollit un pH-metre senzill amb una segona entrada per àcid sulfúric per tal de mantenir el pH constant.

El pH metre elegit és el que es mostra a la Figura 48 que aguanta fins a 6 bar de pressió, altes temperatures (fins a 140°C) i s'utilitza per mesurar el pH en reactors.



Figura 48: pH-metre de la marca Mettler-Toledo

- **Sistema de control de temperatura (termòmetre)**

La part superior del vas constarà també d'un port per a un termòmetre i un sistema termòstat que mantingui la temperatura del bioreactor a 30°C. El termòmetre escollit ha de ser prou llarg per entrar en contacte amb el medi. El de la Figura 49 és de la marca PCE-instruments.



Figura 49: Termòmetre de la marca PCE-instruments

- **Camisa d'aigua per mantenir la temperatura constant**

Per mantenir la temperatura del bioreactor, s'ha elegit una camisa d'aigua. Aquesta anirà incorporada en el disseny del bioreactor i s'escalfarà a 30° mitjançant un intercanviador de calor amb la línia d'esterilització per optimitzar costos.

- **Sistema d'aeració**

El sistema d'aeració inclou un compressor, un anell ruixador, canonades d'entrada i sortida de l'aire, filtres, manòmetres per regular el flux d'entrada de l'aire i una sonda de medició de l'oxigen dissolt.

És una de les parts més importants del fermentador, ja que és una reacció aeròbica i cal assegurar que la bactèria té l'oxigen necessari per proliferar. Cal alimentar el bioreactor de manera contínua i constant.

En apartats anteriors, s'ha establert que el flux d'aire òptim és de 0,5vvm, no obstant, com que els càlculs dels experts anteriors s'han fet amb reactors més petits, a mode de prevenció s'ha decidit augmentar-lo a 1vvm per assegurar-se que l'oxigen no sigui un reactiu limitant de la reacció.

Així doncs, el cabal d'entrada d'oxigen ha de ser el següent:

$$Q_g = 1 \frac{m^3 \text{ gas}}{m^3 \text{ fermentador} \cdot \text{minut}} \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} \cdot 0,25 m^3 \text{ de fermentador} = 4,16 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{s} \quad \text{Eq. 13.1}$$

$$Q_g = 4,16 \cdot 10^{-3} \frac{m^3}{s} = 250 \frac{L \text{ gas}}{\text{min}} \quad \text{Eq. 13.2}$$

- **Deflectors**

Els deflectors són elements soldats dins el vas del bioreactor que permeten reduir els vòrtex del fluid dins del tanc, augmentant l'eficàcia de l'agitació. Aquests obliguen al líquid a realitzar un recorregut sinuós a través del vas, desviant les partícules quan apareixen dins la seva regió i trenquen el moviment circular que imposen els impulsors generant una major turbulència i mesclat. També augmenten la transferència de calor.

Normalment se'n col·loquen quatre equitativament espaiats, però si no és el cas, es recomana posar-ne un nombre parell.

Es per això que s'ha decidit incorporar quatre deflectors tal i com es mostra a la Figura 50.

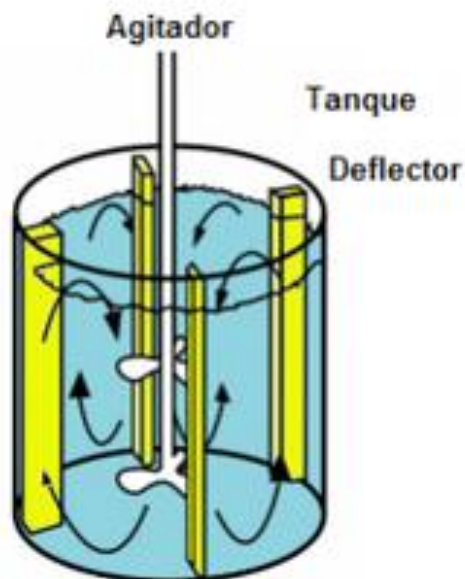


Figura 50: Vas amb deflectors

[56]

c) Disseny

A continuació es mostra el disseny del fermentador fet amb Solidworks®. A l'Annex III s'incorporen les diferents peces en format Solidworks® on es mostren amb detall totes les mesures i plànols del fermentador.

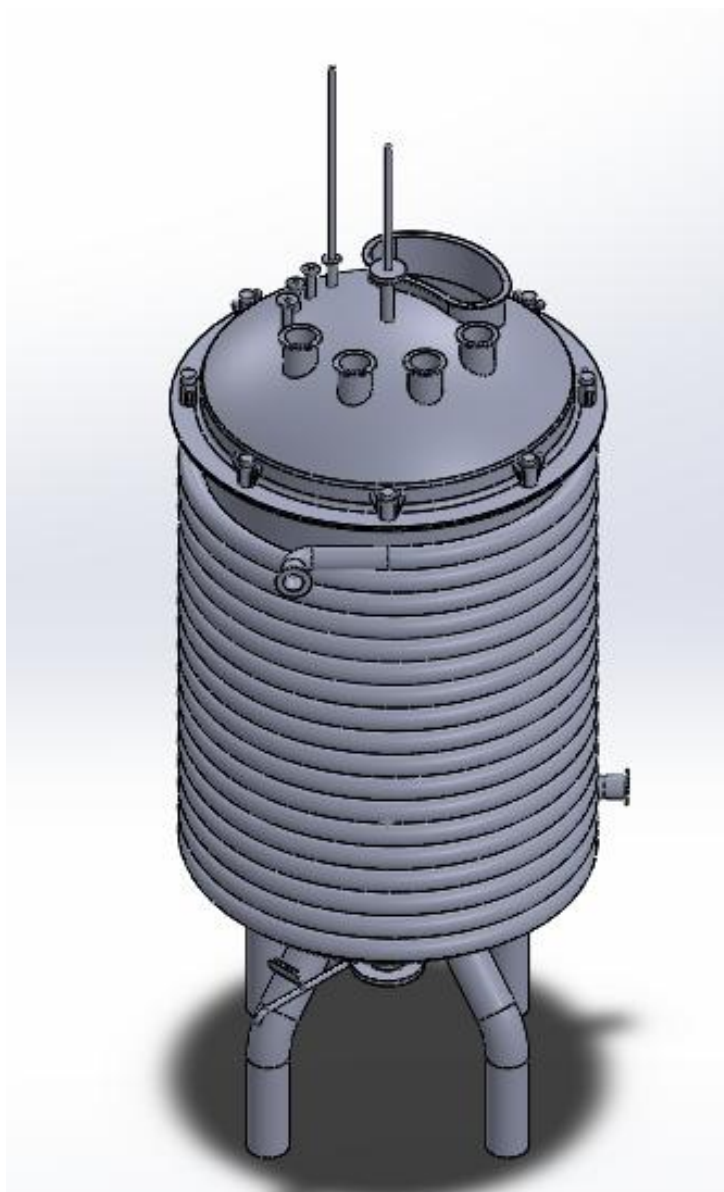


Figura 51: Vas amb camisa

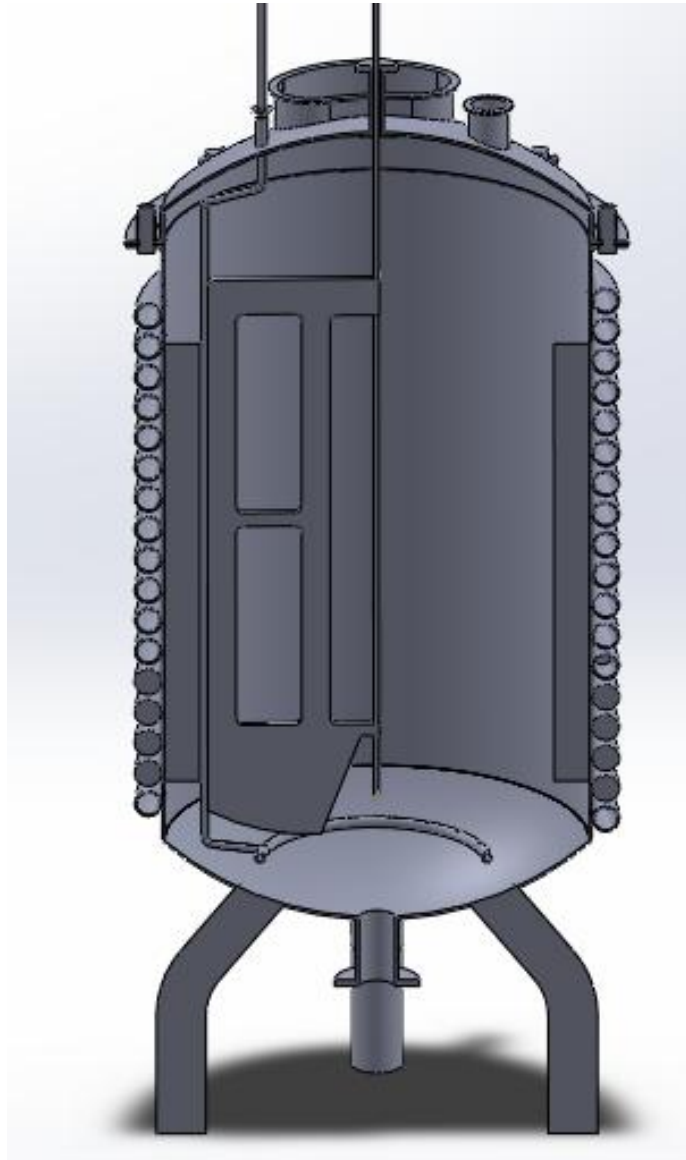


Figura 52: Vas amb deflectors i secció de l'agitador

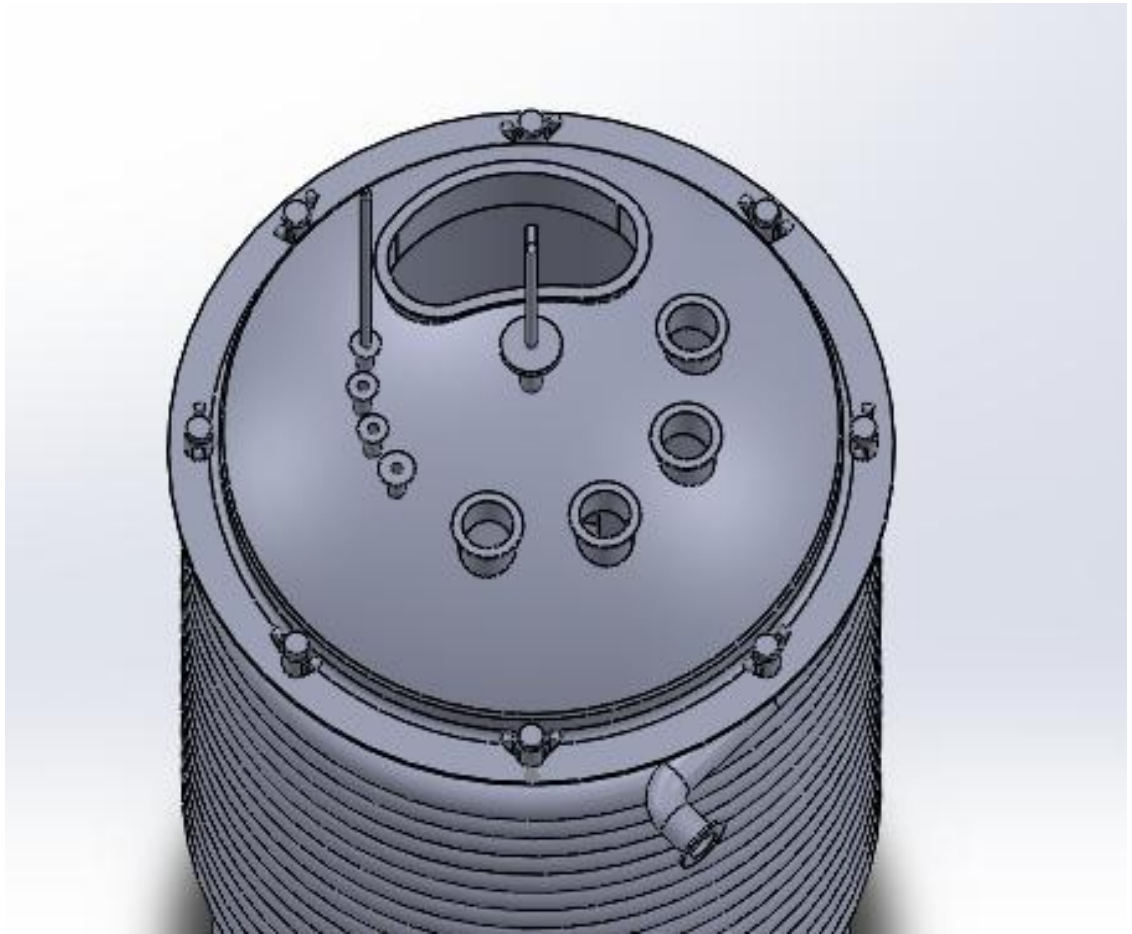


Figura 53: Tapa del bioreactor amb ports i boca d'home

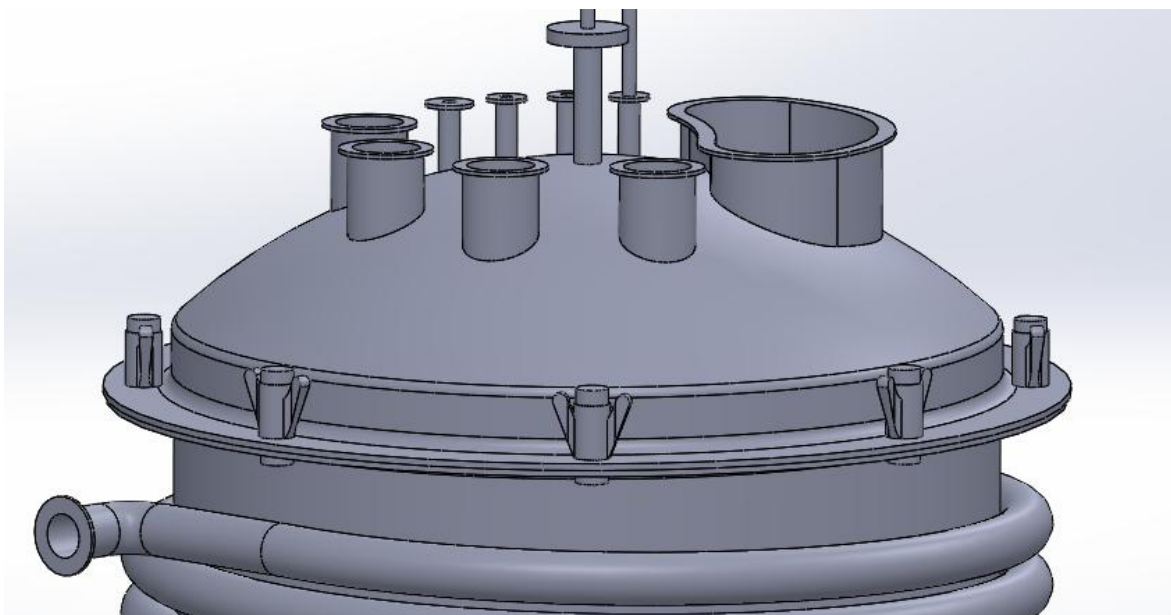


Figura 54: Tapa bioreactor amb cargols i palometes

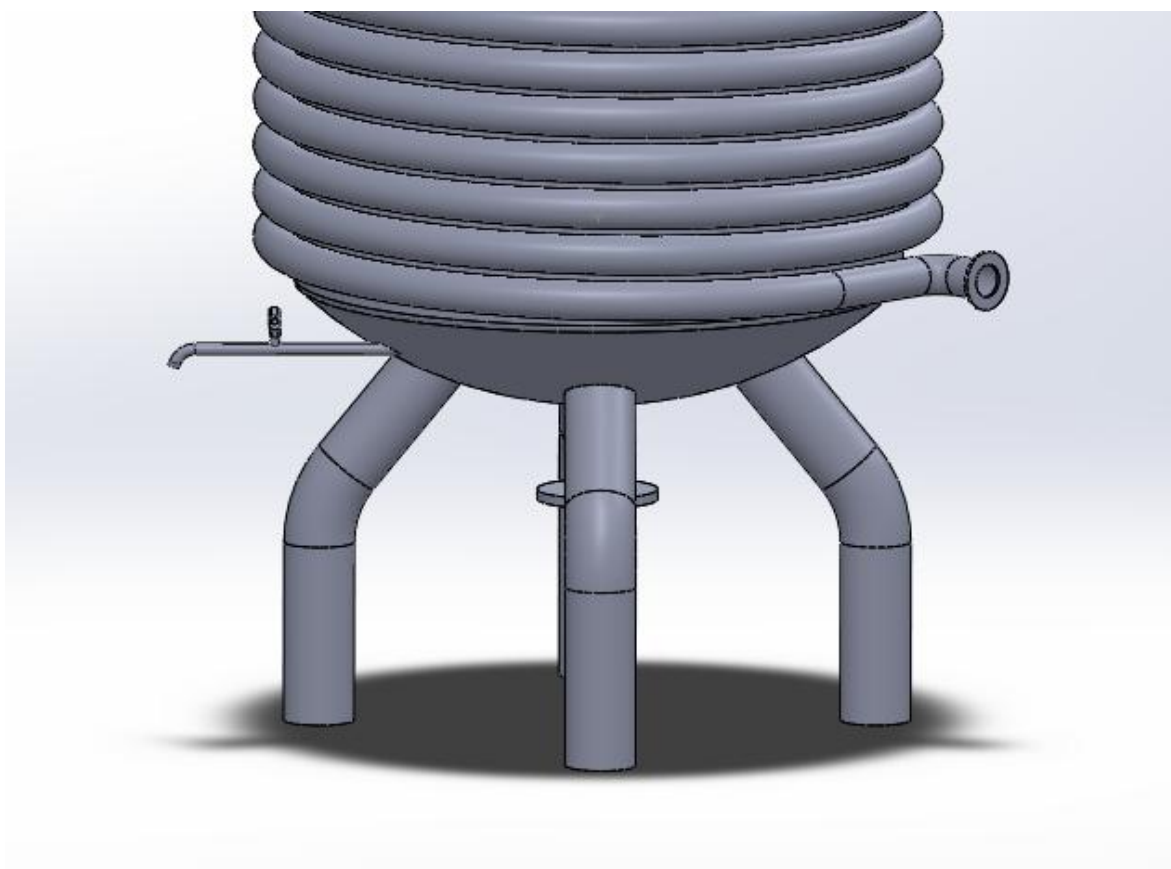


Figura 55: Peus del bioreactor amb aixeta per mostres

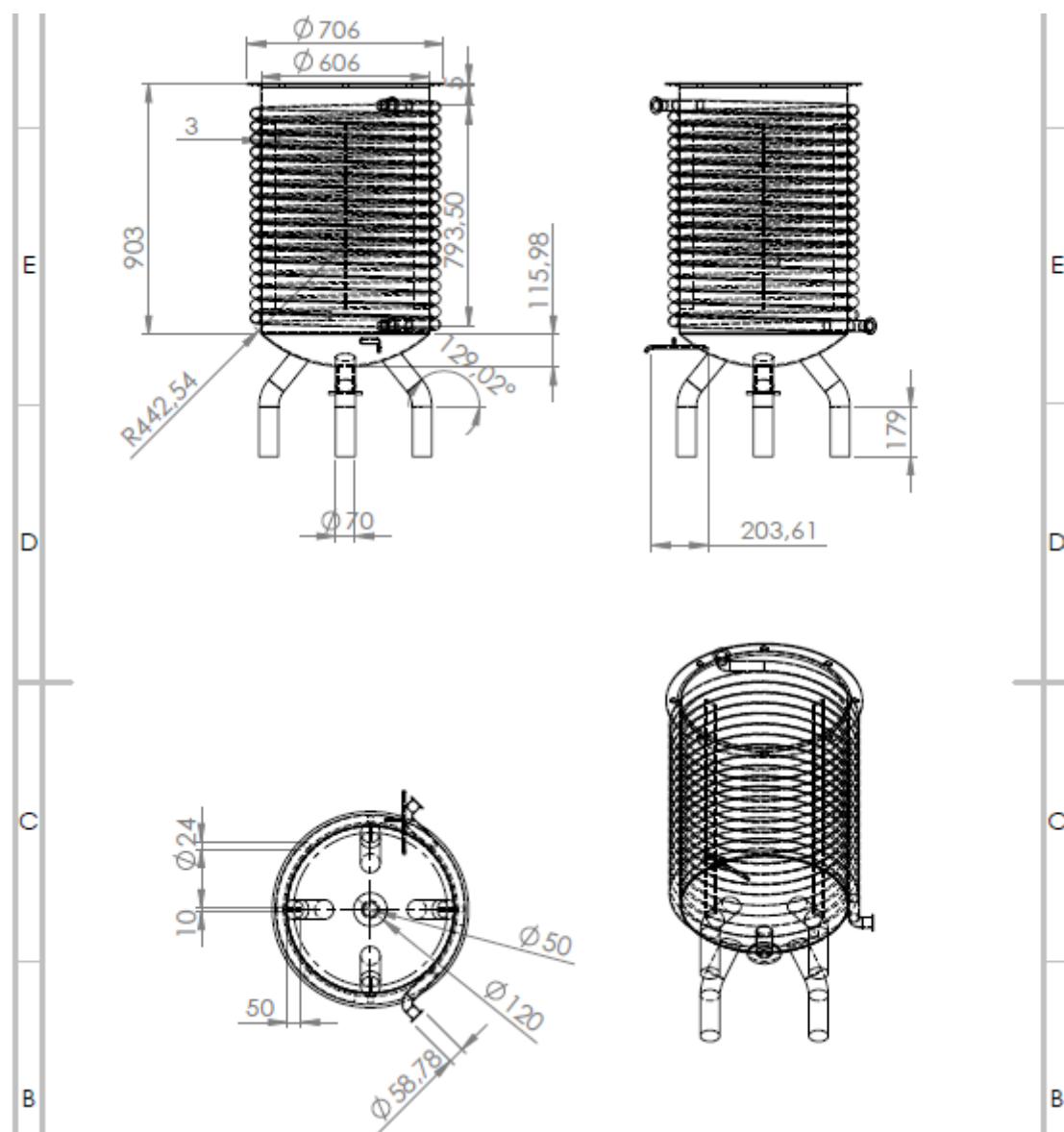


Figura 56: Plànol del vas



Figura 57: Renderitzat del fermentador

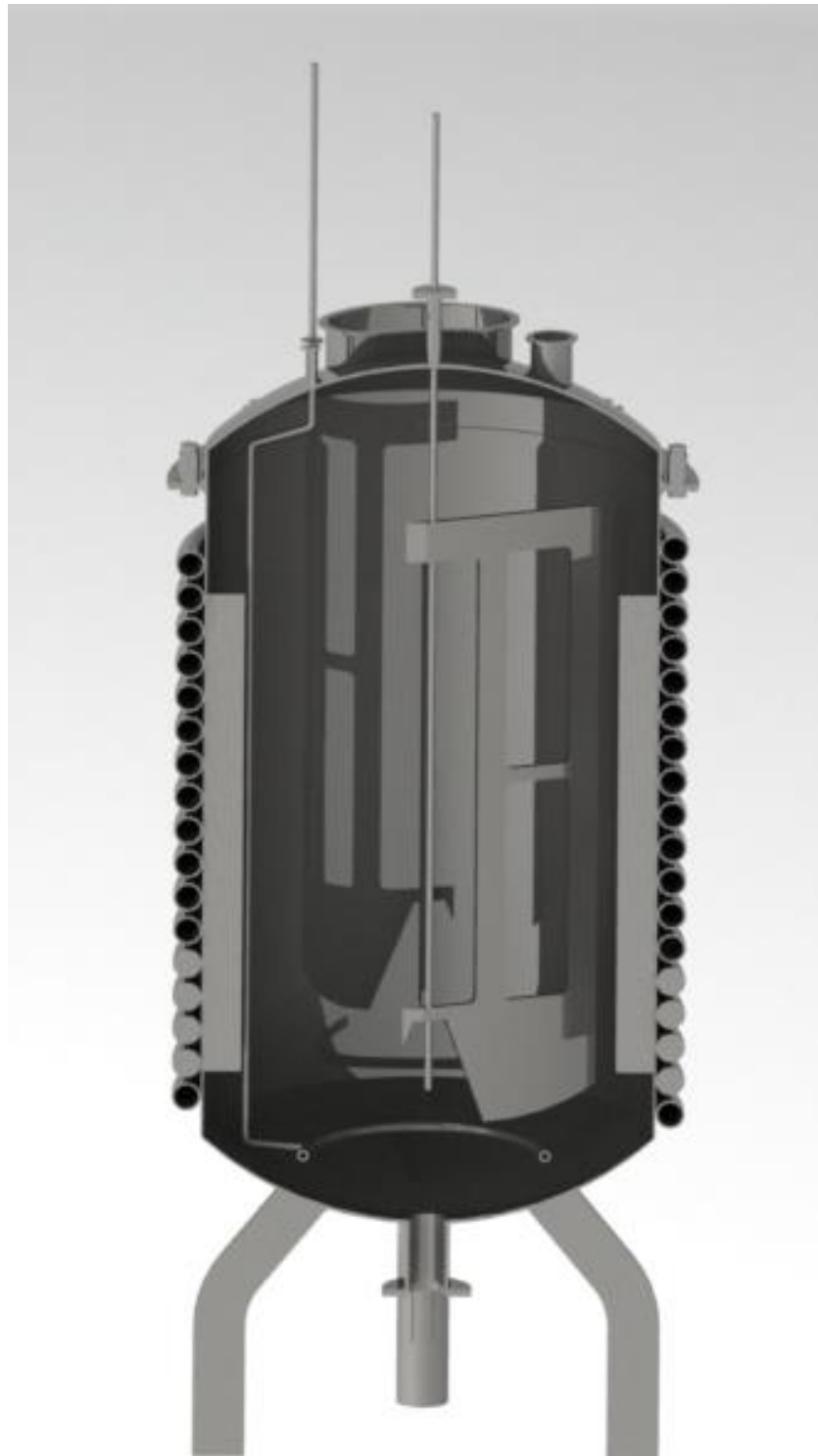


Figura 58: Renderitzat de la secció frontal del fermentador

d) Rendiment

El rendiment d'aquest fermentador s'estimarà en base a la producció estimada. Realitzant una comparativa entre la quantitat de polisacàrids presents en el medi de cultiu inicial i la quantitat de producte en forma de BC obtingut es pot estimar la quantitat assimilada per les bactèries i per tant, el rendiment del fermentador.

Per cada cicle del reactor, s'introdueix un volum de medi de cultiu de **160,5 L**, obtenint-se una producció de **3,21 Kg de BC** (20g/L).

Per altra banda, el medi de cultiu es basa, tal com s'ha vist anteriorment, en **22,72 Kg de mora, 23,19 Kg de pinya, 23,08 Kg de raïm i 21,94 Kg de poma** (aquests valors ja tenen en compte el 10% que s'ha eliminat per filtració) per cada cicle.

És d'esperar que el rendiment variï lleugerament en funció de les fruites que s'utilitzin com a substrat. Així doncs, cal determinar els polisacàrids presents en la fruita per poder estimar el rendiment. Per falta de recursos bibliogràfics, s'han pres dades únicament de la pinya, tenint en compte que el rendiment no es veurà afectat significativament si s'afegeixen les altres fruites.

En la Taula 16 es mostren els diferents polisacàrids presents en el suc de residus de pinya un cop esterilitzats, i el pes de cada un dins els 87,76 L de fruita present al substrat:

Polisacàrid	Concentració	Grams en 87,76L de fruita
Dextrà	1,5 g/L	131,64 g
Sucrosa	40,1 g/L	3519,18 g
Glucosa	23,6 g/L	2071,10 g
Galactosa	2,1 g/L	184,29 g
Fructosa	15,6 g/L	1369,05 g
TOTAL	7,27 Kg	

Taula 16: polisacàrids presents al suc de residus de pinya

Així doncs;

$$\eta = \frac{3,21 \text{ Kg de BC}}{7,27 \text{ Kg de BC}} \cdot 100 = 44,15 \%$$

Un rendiment d'un 44,15 % és un valor prou bo considerant que es tracta d'una planta pilot, no obstant, si es vol escalar a nivells industrials caldria millorar aquest valor per assolir el màxim de beneficis i el mínim de pèrdua de material.

e) Seguretat

A continuació es descriuen les condicions de seguretat que cal dur a terme al manipular el bioreactor.

Cal que el personal dugui, en tot moment, els equips de protecció següents:

Bata de laboratori	
Ulleres de protecció	
Sabates de seguretat	

Guants de nitril	
Còfia	

Taula 17: material de protecció

L'altura del bioreactor no és elevada i per tant el risc és menor; no cal elevar-se per carregar-lo o netejar-lo.

L'NaOH que es fa servir per netejar-lo es altament corrosiu, així que s'estableix la neteja com una de les operacions més crítiques en quant a seguretat.

Pel que fa al producte, està a un pH més bàsic que la pell i per tant cal evitar-ne el contacte directe amb pell i mucoses fins que no sigui net i sec.

Els correctors de pH (àcid sulfúric, per exemple), són també components de pH molt bàsic i cal vigilar-ne la manipulació.

Serà necessària la presència de dutxes i renta-ulls a la planta pilot.

Cal tenir estipulat un pla de contingència en cas que es donés alguna situació de risc potencial, que dependrà de la planta pilot.

5. Estudi econòmic

L'estudi econòmic d'aquest projecte contempla els materials necessaris per construir el bioreactor, un hipotètic temps de muntatge i el pressupost del projecte. Cal remarcar que el projecte és a escala planta pilot, i que per tant caldria escalar els preus en cas que es volgués industrialitzar.

Aquest estudi no ha contemplat els costos de:

- Bombes
- Vàlvules
- Canonades
- Sistema d'esterilització
- Instal·lació de vapor
- Bombona d'oxigen / sistema de subministrament
- Cargols necessaris per les juntes en zones que no siguin la tapa del bioreactor
- El cost de soldar

Les dades que es mostren a continuació són orientatives.

	Component	Preu unitari	Unitats	Preu total
Bioreactor	Vas (AC 316, 3mm gruix)	100 €/m ²	4 m ²	400 €
	Tapa (AC 316, 3mm gruix)	100 €/m ²		
	Agitador Maxblend	500 €/u	1	600 €
	Conjunt de cargols tapa	4 €/u	8	32 €
	Serpentí	500 €/u	1	500 €
	Anell ruixador (AC 316, 3mm gruix)	500 €/u	1	500 €
	Motor 200 W	900 €/u	1	900 €
	pH-metre	95 €/u	1	95 €
	Termòmetre	50 €/u	1	50 €
		Total Bioreactor		
Muntatge	Operaris			4
	Dies			2 setmanes
	Sou			1.500 €/mes
		Total muntatge		
Cost projecte	Mesos dedicats			6
	Enginyers			1
	Salari mensual			2.000 €
		Total cost projecte		
TOTAL				19.277 €

El preu final del bioreactor amb els equips esmentats és de 19.277 €. Afegint a aquest valor un 21 % d'iva, el preu final és de **23.326 €**.

6. Estudi ambiental

En aquest apartat s'estudia l'impacte ambiental del reactor durant la seva explotació. Cal mencionar que és un reactor escala planta pilot, i en aquest cas és un reactor relativament petit, per tant l'impacte que pugui produir serà quantitativament inferior al del reactor escalat per a la producció a nivell industrial. Per una part, el residu principal del bioreactor és el medi de cultiu sobrant de la fermentació, i l'NaOH amb aigua residual del rentat del producte. Així doncs, cal tractar aquests residus un cop produïts abans d'eliminar-los.

El medi de cultiu sobrant consta de restes de fruita i diferents additius, a més de restes de la bactèria activa, amb una acidesa de pH = 5. És necessari neutralitzar aquest residu mitjançant NaOH abans d'eliminar-lo. L'NaOH amb l'aigua residual, per altra banda, es neutralitzarà amb àcid sulfúric per poder-se eliminar de manera segura.

Cal estudiar també l'impacte que tindrà el reactor en quant a emissions de CO₂. La font d'emissió de CO₂ més notable del bioreactor recau en el consum d'energia elèctrica que requereix el motor de l'agitació, comptabilitzada aproximadament en:

$$0,2 \text{ kW} \cdot 280 \text{ dies} \cdot 24 \text{ h/dia} = 1.344 \text{ kWh}$$

Segons la Comissió Europea, cada kWh consumit genera 0,65 kg de CO₂, així doncs, aquest bioreactor generarà un total de **873,6 kg de CO₂** anuals. Aquesta dada és relativament baixa si la comparem, per exemple, amb les emissions de diòxid de carboni anuals d'un cotxe que realitzi 20.000 km/any, a un consum de 120g de CO₂ per cada km; **2.400 kg de CO₂**.

Per altra banda, un cop estudiats els contaminants potencials de l'explotació del bioreactor, cal mencionar també l'impacte positiu que aportarà.

Cal tenir en compte que la cel·lulosa bacteriana és una alternativa a la cel·lulosa vegetal, l'obtenció de la qual genera un impacte ambiental quantitativament major al de la producció de cel·lulosa bacteriana, quan implica la tala d'arbres i l'esgotament dels recursos naturals amb tot el que això comporta.

A més, la principal matèria prima de la cel·lulosa bacteriana que s'obtidria amb aquest disseny, a part dels bacteris, són restes de fruita malmeses; un residu biodegradable que es reaprofitaria com a matèria primera, disminuint l'impacte de la destrucció de la mateixa i

reduint l'impacte ambiental potencial de triar una matèria primera processada com ara la glucosa comercial.

En conclusió, l'explotació d'aquest fermentador no tindria un fort impacte negatiu cap al medi ambient, ja que els beneficis ambientals que aporta tant el seu producte com la seva matèria primera podrien arribar pràcticament als nivells d'emissions per consum elèctric.

7. Planificació del projecte

	feb-16				mar-16				abr-16				may-16				jun-16				jul-16				ago-16				sep-16			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26	S27	S28	S29	S30	S31	S32
Viabilitat i interès del projecte	■	■	■	■																												
Investigació: els materials compostos					■	■	■																									
Investigació: la cel·lulosa bacteriana i la seva obtenció									■	■	■																					
Investigació: tipus de bioreactors													■	■	■																	
Recerca d'estudis de producció de BC													■	■	■																	
Elecció dels paràmetres de funcionament																	■	■														
Disseny de les parts del bioreactor																					■	■										
Dimensionat del bioreactor																					■	■	■									
Realització de plànols i renders																									■	■	■	■				
Anàlisi de seguretat																									■							
Estudi econòmic																									■							
Estudi d'impacte ambiental																									■							
Revisió general del projecte																													■			
Presentació del document																													■			
Defensa oral del projecte																															■	

8. Conclusions

En conclusió, aquest projecte ha aconseguit l'assoliment dels seus objectius tant principal com secundaris proporcionant un disseny complet d'un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana a escala pilot.

El disseny realitzat, és un reactor discontinu agitat tipus Maxblend que permet produir 3,21 Kg de cel·lulosa bacteriana mitjançant la bacteria *l'Acetobacter Xylinum subsp. Sucrofermentans* en cada cicle de 72 hores del reactor, afegint una quantitat de 160,5 L de substrat.

El substrat indicat per a aquest bioreactor és un medi a base de fruita malmesa o en estat de descomposició, a base de 25 Kg de mores, 25,5 Kg de pinyes, 24,1 Kg de poma i 25,4 Kg de raïm i additius com l'àcid nicotínic, la piroxidina, l'àcid p-aminobenzoïc i un agent antiespumant.

La mescla dins el reactor ha d'estar a unes condicions de 1 vvm., 30°C, i pH=5, i el reactor està dimensionat amb un volum de 250 L.

Durant el procés d'explotació del reactor no hi ha un alt nivell de riscos; la seguretat a la planta pilot és equivalent a la seguretat que s'ha de tenir en compte en un laboratori amb reactius àcids i bàsics.

El cost final de l'equip és de 12.277,87 € amb l'iva inclòs i les emissions de CO₂ anuals es computen amb 873,6 kg de CO₂.

Així doncs, es pot concloure que s'ha aconseguit dissenyar un bioreactor per a la producció de cel·lulosa bacteriana respectuós amb el Medi Ambient i amb un rendiment del 44,15 %, valor que es considera eficient.

En la lectura d'aquestes dades cal tenir en compte que no s'ha realitzat cap estudi experimental.

9. Agraïments

Vull agrair al meu tutor, Jordi Bou, l'ajuda i el recolzament que m'ha aportat al llarg d'aquest treball.

Agraeixo també a la meva família l'acompanyament i força que m'han donat al llarg dels meus estudis; la meva mare, el meu pare, el meu germà, la Caterina, el Pau i el Toni.

10. Bibliografia

1. **Steinbüchel, Alexander.** *Biotechnology of Biopolymers. From synthesis to Patents.* Weinheim : Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31110-6.
2. ¿Qué es la nanocelulosa? 2014 <http://www.muyinteresante.com.mx/preguntas-y-respuestas/13/04/12/nanocelulosa> [En línia] 21/03/2016
3. **Centre d'innovació i tecnologia,** *Materials Compostos* http://cit.upc.edu/es/destacados/materiales_compuestos[En línia] 21/03/2016
4. **S. Poveda,** *Materiales compuestos* http://ocw.upm.es/expresion-grafica-en-la-ingenieria/ingenieria-grafica-metodologias-de-diseno-para-proyectos/Teoria/LECTURA_COMPLEMENTARIA/MATERIALES/materialescompuestos.pdf [En línia] 21/03/2016
5. **Callister, William D.** *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales.* Bogotá : Reverté, 1996. ISBN 8429172548.
6. *Compuestos reforzados con partículas* http://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm15/pfcm15_9_1.html [En línia] 23/03/2016
7. *Compuestos reforzados con fibras* http://www.upv.es/materiales/Fcm/Fcm15/pfcm15_9_2.html [En línia] 25/03/2016
8. http://fog.ccsf.cc.ca.us/~wkaufmyn/ENGN45/Course%20Handouts/14_CompositeMaterials/03_Fiber-reinforcedComposites.html [En línia] 26/03/2016
9. **Enlighten,** *Fiber reinforced composites* <http://altairenlighten.com/2012/06/thermosets/> [En línia] 26/03/2016
10. **Aula virtual de Biología,** *Polisacáridos* <http://www.um.es/molecula/gluci05.htm> [En línia] 28/03/2016
11. **M. Schramm, Z. Gromet, and Shlomo Hestrin,** *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 3. Substrates and inhibitors.* Biochem J. 1957, 67, 669–679.
12. **Apuntes de biología celular.** *Carbohidratos.* <http://www.angelfire.com/bc2/biologia/carboh.htm> [En línia] 29/03/2016

13. **Cristian Grande.** *Desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas* 2014. Tesis Doctoral Universitat de València
14. **D.L. Kaplan.** *Biopolymers from Renewable Resources.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1998. ISBN 978-3-642-08341-9.
15. **Robert J Moon et al,** *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites* 2011. Purdue University, Purdue e-Pubs Birck and NC N Publications
16. **I.B.I Mariana Quintana Quirino,** *Estudio de la producción y caracterización de celulosa por cultivo sumergido de *Gluconacetobacter xylinus*,* 2015. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana de México
17. **JL Chávez- Pacheco et al.** *Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones.* Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 2004,7, 18
18. **Klemm, D., Schmauder, H. & Heinz, T.** *Bacterial cellulose in Biopolymers Vol. 5 Polysaccharides from prokariots,* 2005, Alexander Steinbüchel Ed. Wiley .
19. **Biotechnology Biobusiness News** <http://www.biotechnology-pl.com/> [En línia] 1/04/2016
20. **Wen-Hua Gao et al.,** *Properties of bacterial cellulose and its influence on the physical properties of paper,* BioResources 2011, 6, 144
21. **John F Kennedy et al.** *Cellulosics Pulps: Fibers and Materials* 2000, Woodhead Publ. Ltd
22. **B Laskiewicz and JA Cuculo,** *Solubility of cellulose III in sodium hydroxide solution,* J Appl Polym Sci 1993,50, 27
23. **Vicente Amigó, M^a Dolores Salvador, Oscar Sahuquillo** *Aprovechamiento de residuos de fibras naturales como elementos de refuerzo de materiales poliméricos* Comunicaciones del quinto congreso internacional de fibras naturales 2009
24. <http://www.ftb.com.hr/>[En línia] 4/04/2016
25. **Rainer Jonas & Luiz F. Farah,** *Production and application of microbial cellulose,* Polym Deg Stab, 1998, 59, 101
26. **Xue Li, Lope G. Tabil, Satyanarayan Panigrahi** *Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review.* Journal of Polymers and the Environment, 2007, 15, 25–33

27. **Weili Hu, ShiyanChen, Jingxuan Yang, Zhe Li, HuapingWang** *Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites*. Carbohydr Polym 2014,101,1043
28. **Luz Dary Carreño Pineda, Luis Alfonso Caicedo Mesa y Carlos Arturo Martínez Riascos** *Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión* Revista de Ingeniería y Ciencia 2012, 8, 12
29. **Faezah Esa, Siti Masrinda Tasirin, Norliza Abd Rahman** *Overview of Bacterial Cellulose Production and Application* Agriculture and Agricultural Science Procedia 2014, 2,113
30. **Bernard Atkinson**. *Reactores Bioquímicos*. Ed. Reverté, 2002. ISBN: 84-291-7009-X.
31. *Fermentaciones Industriales*
http://informersalamanca.com/contenido/up/1353/anafouces-20150511154231/docs/TEMA_9_micro.pdf En línea [10/05/2016]
32. *Tipos de fermentadores*
<http://webcd.usal.es/Web/educativo/ampliacion3/fermentador.htm> En línea [10/05/2016]
33. *Reactores Químicos y Biológicos*
<http://www.criba.edu.ar/cinetica/reactores/CAPITULO%208.pdf> En línea [11/05/2016]
34. **Danny Sanchez** *Fermentacion* <http://bioprocfarm.blogspot.com.es/2014/09/capitulo-4-principales-tipos-de.html> En línea [10/05/2015]
35. Biochemical engineering Journal, Elsevier
36. *Producción Microbiana Industrial*
<http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%205&tc=3&nc=5&art=175>
En línea [31/05/2016]
37. : **Mahmood K.H. AL-Mashhadania, ,Stephen J. Wilkinsonb, William B. Zimmermanc** *Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes* Chemical Eng Science 2015, 137,243
38. *The Airlift Fermenters* <http://www.slideshare.net/swatikod/airlift> En línea [22/05/15]
39. **Fidel Cunill, Montserrat Iborra, Javier Tejero** *Apuntes de Ampliación de reactores químicos*. UB, 2010.
40. **Tohru Khouda, HisatoYano, Fumihiro Yoshinaga** *Effect of Agitator Configuration on Bacterial Cellulose Productivity in Areatedand Agitated Culture*: Journal of Fermentation and Bioengineering 1997, 83, 371
41. **MitsuoTakai, Yasushi Tsuta, Sadayoshi Watanabe**. *Biosynthesis of Cellulose by Acetobacter Xylinum. I. Characterizations of Bacterial Cellulose*. Polymer Journal, 1975, 7, 137
42. **Angela Faustino Jozala i col-laboradors**. *Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylunus by employing alternative culture media*: Applied Microbiology and Biotechnology 2015, 99, 1181

43. **Nolasco Terron**, *Cinética de crecimiento celular: Ecuación de Monod*
<http://es.slideshare.net/edya69/ecuacin-de-monod-copia> En línia [05/06/2016]
44. **Gòdia, F. y López, J.** *Ingeniería Bioquímica*. Editorial Síntesis Madrid 1999.