

2. FASE EXPERIMENTAL

2.1 Introducción

En este estudio sobre la producción de bioetanol a través de melaza y la actividad de las levaduras *Saccharomyces*, se han llevado a cabo una serie de experimentos.

Estos experimentos se han realizado con la finalidad de obtener la cinética seguida por los reactivos y productos. Además sirve como base para el desarrollo de un modelo matemático. Sabiendo las tendencias de las variables de operación en el proceso y fijando otras, se puede llegar a simplificar un sistema de ecuaciones complejos y resultar así un modelo sencillo y a la vez representativo. Esto es mediante el uso de una función objetivo. Tal función se puede optimizar y conseguir así el diseño más eficiente.

Mediante la fase experimental se obtienen las tendencias de las variables del proceso. Además con ella se puede comprobar las hipótesis y las teorías que se han desarrollado en los capítulos anteriores.

Se ha de decir, que con el equipo utilizado de medida, no se ha podido hacer un seguimiento continuo de las variables necesarias para hallar la cinética de forma experimental. Pero sí se ha podido estudiar la evolución de importantes factores como el pH, la concentración de un parámetro que relaciona a todos los experimentos, tal parámetro se refiere a la concentración de sacarosa junto con la de alcohol, ya que su medida se realizaba a través del refractómetro, y éste no era capaz de separar los dos componentes por separado. También se ha podido estudiar la influencia de la aireación en el proceso y de la agitación.

Con la instalación de una columna de destilación sencilla se halló la cantidad final de alcohol obtenida en cada experimento, esto indicará el rendimiento de cada uno de los susodichos experimentos.

Sabiendo todo lo anterior, la cinética se obtendrá de la bibliografía recogida y mediante el estudio de experimentos de mayor rigor.

Los pasos seguidos en el periodo experimental, de forma esquemática, han sido los que se describen a continuación.

- Preparación del sustrato.
- Siembra e incubación de microorganismos.
- Operación en el reactor de mezcla perfecta.
- Decantación del producto obtenido.
- Separación del etanol mediante una columna de destilación.
- Filtración de la fase densa, pesada de microorganismos producidos.
- Cálculos
- Observaciones en base a los resultados gráficos y analíticos.
- Incidencias, errores, hipótesis aplicadas.

2.2 Preparación del sustrato

Se parte de melaza, un subproducto de la remolacha. La melaza contiene una gran cantidad de azúcares, en forma de sacarosa, en una proporción cercana al 45%. A causa de esta excesiva cantidad de azúcar es conveniente diluirla para poder usarla como sustrato de la levadura. Las diluciones se realizarán a diferentes concentraciones siendo el máximo de azúcar permitido alrededor del 20% en volumen.

En un recipiente de agua caliente se echará una cantidad precisa de melaza viscosa y se agitará para conseguir una buena disolución.

Una vez obtenida la mezcla ésta se filtrará para quitar las impurezas de la propia melaza. Estas impurezas son de carácter sólido y pueden ser negativas para el proceso de fermentación.

Cuando ya se tiene diluida la melaza, se le añade 5g/l de fosfato diamónico, esto hace más nutritivo al sustrato, ya que se añade macroelementos como el fosfato y el nitrógeno ausentes en el sustrato original. La cantidad a añadir de esta sal dependerá de la cantidad en gramos de melaza que se ha usado para realizar la disolución.

La disolución de melaza tiene un pH alto que se ve incrementado por la adición del fosfato. Este pH se ha de disminuir hasta uno ácido ya que uno demasiado básico es perjudicial para la actividad de las levaduras.

Entonces, la disolución se acidificará llegando a un pH mínimo de 4. Este pH ácido evita la contaminación del sustrato con otros microorganismos sin interés industrial.

Al acidificar el sustrato se consigue un medio hostil apto para un pequeño grupo de microorganismos. Este pequeño grupo corresponde a la *Saccharomyces*, que es el hongo que fermentará los azúcares y los transformará en etanol.

Además, el sustrato será calentado hasta unos 80 °C, donde las bacterias y hongos existentes en él desaparecerán, pero las esporas permanecerán ya que se ha de llegar a una temperatura de unos 120°C para romperlas. Así que con este hecho ya se introduce un factor que restará eficiencia al proceso de producción de etanol.

Después se enfriará rápidamente haciendo pasar agua por las paredes exteriores del recipiente que lo contenga. Hacia una temperatura cercana a los 30°C estará listo para ser usado como caldo de cultivo y fermentativo.

De forma esquemática, los pasos a seguir para la preparación del sustrato son los siguientes:

- Dilución de la melaza
- Clarificación
- Filtración de la mezcla
- Adición de macronutrientes y micronutrientes
- Acidificación
- Esterilización

1. Dilución de la melaza

De la dilución dependerá la cantidad de sacarosa introducida al reactor.

A través del uso del refractómetro, previamente calibrado, se hallará la cantidad en %v/v de sacarosa. Esta variará desde un 12% a un 20% en los sucesivos experimentos.

La cantidad de azúcares fermentables no puede ser excesiva ya que crearía una situación perjudicial en el desarrollo de la actividad de las levaduras. Éstas se agobiarían y su actividad disminuiría fuertemente.

Tampoco puede ser deficiente, ya que la carencia de los elementos nutritivos evitaría el desarrollo pleno de las funciones vitales de los microorganismos y como consecuencia se reduciría la producción de etanol.

Los g/l de sacarosa añadidos variaran para así obtener diferentes experimentos en donde se puedan comparar los resultados y ver así la eficiencia de cada experimento.



Fig.1 Melaza sin diluir



Fig. 2 Dilución de la melaza en agua caliente



Fig. 3 Homogenización de la mezcla

2. Clarificación

La disolución de la melaza en agua debe clarificarse antes de ser usada como sustrato. Esta clarificación se puede hacer mediante el uso de un centrifugador o a través de la sedimentación por gravedad.

En este caso se dejó sedimentar en una columna durante 24 horas. Así se recogió el clarificado y éste fue filtrado en la siguiente etapa.

La clarificación favorece la transferencia de oxígeno y además reduce la formación de espumas.

3. Filtración de la melaza

El clarificado se dejó reposar sobre varios papeles de filtro y se recogió en varios Erlenmeyer. Las impurezas quedaron en el filtro y se obtuvo un sustrato más puro.

4. Adición de macronutrientes y micronutrientes

La melaza proveniente de la remolacha contiene una gran variedad de macronutrientes y vitaminas tales como los que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Composición detallada de la melaza

Componentes	% v/v
Sacarosa	45 - 52
Agua	15 -20
Cenizas	8-12
No Azúcar orgánica	20-22
No Azúcar inorgánica	9-10
Nitrógeno total	2-3

La melaza tiene una densidad de 1,3 a 1,4 kg/m³. La composición de la melaza es muy variable ya que depende del tipo de cultivo y el proceso seguido para la fabricación del azúcar. La sacarosa contenida en la melaza va acompañada de pequeñas cantidades de rafinosa y de azúcar invertido. El no azúcar está compuesto por materias orgánicas nitrogenadas, no nitrogenadas y cenizas.

La materia orgánica no nitrogenada comprenden los ácidos orgánicos tartáricos, málico, cítricos... y también pectina, pentosa y las gomas.

La adición de nitrógeno y fósforo a través del fosfato diamónico aporta una mejora en la calidad del sustrato.

La adición de esta sal dependerá de la cantidad en masa absoluta de melaza utilizada, ésta se pesará previamente a su dilución.

5. Acidificación

En esta etapa se pretende bajar el pH y crear un medio hostil donde no puedan vivir microorganismos diferentes a la *Saccharomyces Cerevisiae*. El pH se acidifica hasta uno que permita la vida de las levaduras, éste está en un rango de 4 a 4,5.

A través de la adición de ácido clorhídrico y de un agitador magnético que homogenice la mezcla se acidifica el medio de fermentación. Un indicador de pH mide de forma continua la disolución hasta que se obtiene una mezcla ácida. El volumen de ácido adicionado depende de la cantidad de disolución a acidificar, si ésta es de aproximadamente 1200 mililitros, la cantidad de ácido oscila entre unos 50 ml y 70 ml.

6. Esterilización

La esterilización es de vital importancia en la producción de bioetanol a través de la levadura, ya que si coexisten otras especies que no realizan la tarea de fermentación vía alcohólica, el rendimiento del proceso baja de forma considerable. Esto quiere decir, que la materia nutritiva es consumida por un mayor número de microorganismos y no es transformada en etanol sino en otros subproductos que no tienen interés industrial. Se crea una competencia entre diversos microorganismos en el medio de fermentación, una lucha por el consumo de nutrientes.

Se debe señalar, que en las actuales condiciones del laboratorio, donde se ha operado, es imposible llegar a la esterilización.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, se intentó el siguiente procedimiento, esterilización por vía térmica.

El sustrato es calentado a unos 80°C mediante una placa. El tiempo de calentamiento es corto, alrededor de unos 15 minutos para un volumen de 1000 ml.

Previamente se calienta el reactor a unos 70 °C. Esto se realiza a través del uso de un baño térmico, el cual hace circular agua hacia una camisa que envuelve al reactor.

Se introduce el sustrato calentado y se mantiene la temperatura durante 30 minutos. Después, se hace burbujear aire a través del medio y mediante la camisa comienza a circular agua a temperatura ambiente. Así comienza el periodo de enfriamiento rápido, donde se hace pasar al sustrato de 75°C a 30°C.

Con todo esto se consigue la reducción de bacterias y hongos, pero no se llega a romper las esporas, ya que para ello se debe alcanzar mayores temperaturas, alrededor de los 120°C.

De todas formas, un calentamiento excesivo de sustrato causa la descomposición de la materia orgánica de dicho sustrato, y con ella la de los nutrientes.

Por ello es preferible un periodo de calentamiento y enfriamiento rápido, y una fase de mantenimiento corta a una temperatura alta.

2.3 Siembra e incubación de los microorganismos

La *Saccharomyces Cerevisiae* pertenece al reino de los hongos. Es una levadura y es muy utilizada en la producción de cervezas, vinos,...

La usada en concreto en este estudio pertenece a la cepa IFI 256 silvestre. Proviene del norte de España. Por este motivo, aguantan bajas temperaturas, pero se desarrollan mejor a unos 30°C. Este cultivo se mantiene en un medio sólido, de agar. Se debe conservar en frío, y dependiendo de la temperatura de almacenamiento su duración será mayor o menor. Si se guarda en un frigorífico puede durar hasta un mes. Si se mantiene a -20°C su duración será mayor. Y para almacenarlo como stock a -80°C es necesario el uso de glicerol o leche. Así se evita la cristalización de la levadura y su consecuente rotura. Este almacenamiento a tan baja temperatura precisa de nitrógeno líquido.

Cuando se mantiene el cultivo a unos 5°C es necesario repiques periódicos cada mes en medio de cultivo fresco.

El cultivo fresco sólido usado es el llamado YPD. En él se realiza la siembra de la levadura en forma de zigzag a través de un palillo de dientes esterilizado. El motivo de esta forma de siembra es para conseguir diferentes colonias isogenéticas, de iguales genes.

Este cultivo se realiza sobre una caja de petri, una vez que se ha hecho la siembra se introduce en una estufa y se mantiene a 32°C durante 48 horas. Así se desarrollan mediante el consumo de nutrientes y el efecto de una cálida temperatura que hace aumentar su crecimiento.

Si se pretende una duración mayor del cultivo, éste se ha de guardar en nitrógeno líquido, se tomarán 828 µl de cultivo estacionario de 48 horas y se le adicionarán 172 µl de glicerol 87. Su congelamiento se hará en nitrógeno líquido a unos 80°C bajo 0.

Así se asegura su almacenamiento en un largo periodo de tiempo, haciendo posible su uso en cualquier momento activándolo con calor.

Otro método usado, y quizás el más eficiente es la liofilización, pero es muy complejo y se requiere de mayor tecnología.

La liofilización consiste en sacarle el agua a una sustancia congelada omitiendo el estado líquido. Se congela una solución acuosa de la sustancia química que se desea liofilizar y, a esa baja temperatura que impide cambios químicos de deterioro, se le somete a un alto vacío que hace pasar el agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajísimas, sin el deterioro que produciría el recalentamiento.

Tal vez el método más satisfactorio sea el descrito anteriormente, aunque pueden emplearse con éxito cualquier otro método que asegure la estabilidad, o sea que no se produzcan cambios en las propiedades bioquímicas del microorganismo.

1. Procedimiento de siembra

Se parte de una caja de petri que contiene la cepa IFI 256 de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. Se ha de crear una atmósfera reductora donde se pueda operar sin riesgo de contaminación. Con un mechero de laboratorio se obtiene un pequeño radio de ambiente reductor. Este mechero se coloca bajo una campana. Antes de comenzar el proceso de siembra se prepara el sustrato.



Fig.4 Cultivo de Saccharomyces Cerevisiae en YPD sólido.

El cultivo de la izquierda está sano. El de la derecha está contaminado.

Se ha de esterilizar los recipientes en donde se van a realizar las inoculaciones del sustrato. Estos serán erlenmeyer de 250 ml. Se introducirán en la estufa y se calentarán hasta 120 °C. Cuando se alcanza tal temperatura se mantiene la operación de esterilización durante 10 minutos. Después se transportarán hacia zona de operación reductora y se meterán en un baño de agua fría. Así se conseguirá enfriarlos rápidamente. El agua no debe introducirse en el interior de tales recipientes.



Fig. 5 Fase de esterilización y siembra en atmósfera reductora.

Las bocas de los erlenmeyer se harán pasar por la llama del mechero. Después se introducirá una cierta cantidad de sustrato debidamente elaborado y a una temperatura no superior a los 40°C. Con la ayuda de un palillo de diente previamente esterilizado se cogerá una pequeñísima muestra de levadura de la caja de petri. Bastará con deslizar el palillo de diente de forma suave por unas de las colonias en zigzag existentes sobre el agar. Este palillo se introducirá en el erlenmeyer y se realizará una pequeña agitación manual.



Fig. 6 Fase de siembra y repiques periódicos.

Para esterilizar el palillo, se introduce en un baño de agua hirviendo y después, húmedo, se pasa por la llama del mechero.

Normalmente, para la esterilización del material a usar en la siembra y en el proceso de fermentación, se requiere de un autoclave. Éste es un recipiente donde se pueden introducir todos los elementos que requieran esterilización y se someten a presión con vapor. Además todos los conductos y sistemas deben ser sometidos a un chorro de vapor.

En este caso se carecía de un autoclave y se hizo de una forma sencilla que no aseguraba el 100% de esterilización.

Sin embargo, se ha de tener en cuenta, que en el proceso de fermentación se genera alcohol. Y éste actúa como desinfectante de microorganismos extraños al proceso. Por ello, el riesgo de contaminación disminuye. Además la acidificación del sustrato también previene de la existencia de microorganismos competentes por los nutrientes.

También se podía haber usado una olla a presión.

Después de inocular con los hongos el sustrato, el erlenmeyer es tapado con algodón llevado a una estufa donde se dejará incubando durante 72 horas y a una temperatura de unos 32°C.

Durante este periodo la colonia de levadura sumergida en el medio se alimentará de los nutrientes existentes y crecerá hasta llegar al estado estacionario. Depositándose en la parte inferior del recipiente, ya que tales microorganismos sedimentan bien. En esta incubación es aconsejable introducir agitación en la mezcla.

Al cabo de los tres días, se puede encontrar una fina capa blancuzca con tintes marrones en el fondo del erlenmeyer. Esta capa es la levadura generada. Se procuran unas condiciones donde se fomente el crecimiento de la levadura, que es el objetivo marcado para la posterior siembra del reactor de fermentación.

Cuando se obtiene esta capa, cuidadosamente se extrae el líquido clarificado, es decir, el alcohol producido mezclado con los demás elementos.

Una vez separadas ambas fases se puede proceder de dos formas para obtener la levadura. Una sería filtrar la levadura y posteriormente usarla, de forma húmeda o seca para inocular el reactor u otras siembras.

La otra sería usar directamente este pequeño volumen de sustrato inoculado para sembrar el reactor.

Las dos opciones son aceptables y la usada en este caso es la segunda, porque así se evita usar otros recipientes e instrumentos que no llegarían a ser totalmente esterilizado, a causa de la falta de medios.

El proceso de siembra se suele realizar en serie, es decir, que a partir de un medio inoculado donde se ha llegado al crecimiento estacionario de los microorganismos, se replica otros medios de sustratos frescos en diferentes recipientes.

Y a través de la siembra de estos nuevos medios se sigue inoculando otros.

Así se consigue aumentar la cantidad inicial de levadura contenida en la caja de petri que fue sacada del congelamiento. Y además se renueva haciendo que su calidad mejore.

En el proceso de siembra se ha utilizado cantidades de sustratos diferentes contenidos en erlenmeyer de iguales tamaños. Así se puede estudiar la velocidad de dilución. Y como afecta el aire en el crecimiento de los microorganismos.

También se varió el pH en las distintas siembras para estudiar su influencia en la situación planteada, además de añadir diversas cantidades de sales.

2.4 Operación en el reactor

Para la realización del estudio, se utiliza un reactor de mezcla perfecta de capacidad 2 litros. Con un agitador y una camisa envolvente para su calefacción con la ayuda de un baño térmico. Además se tiene una entrada inferior de aire que procura la cantidad de oxígeno disuelto necesario para la fermentación en el reactor.



Fig. 7 Reactor y baño térmico.

En principio se opera en discontinuo para estudiar la cinética del proceso con la intención de operar en un futuro en continuo. Sin embargo las expectativas variarán al no encontrar unas buenas condiciones para realizar el proyecto. Como el reactor es de pequeño volumen se prefiere operar en discontinuo y semicontinuo para todo el estudio de la fermentación.

A través de un refractómetro se mide la variación de un parámetro conforme avanza el proceso. Este parámetro corresponde a la concentración de sacarosa en el medio. Aunque no se puede decir con plena certeza que no intervengan otros compuestos en la señal que resulta de su medición, ya que el propio etanol también es analizado por dicho instrumento.

Para calibrar el refractómetro a este estudio, se toma una cantidad conocida de melaza, la cual se diluye a una concentración determinada. De esta mezcla se toma una alícuota que se lleva al refractómetro y se puede comprobar que mide la misma concentración en %v/v. Antes de tal procedimiento se toma una mezcla conocida de azúcar disuelta en agua y se demuestra el calibrado del refractómetro para la medición de azúcares.

Para realizar este proyecto se requiere el uso de un cromatógrafo de líquidos para hallar las diferentes concentraciones de etanol, sacarosa y biomasa en los diversos tiempos que ocupa el proceso. Así se puede trazar una curva para cada compuesto y mediante una regresión obtener la cinética de cada componente.

Sin embargo, al ser esto una tarea imposible ya que se carece de medios suficientes, se hace el estudio a través del parámetro de concentración de sacarosa medido por el refractómetro.



Fig. 8 Formación de espumas causada por la aireación.

Este parámetro no representa la evolución de los azúcares conforme avanza el tiempo ya que en él también influye la cantidad de alcohol producido. Por eso, como se verá más adelante, este factor de concentración irá disminuyendo hasta llegar a un valor en cual se compensa la cantidad de alcohol producida con la de azúcares consumidos.

Se podría pensar que tal parámetro no es representativo, pero si se ve desde el punto de vista comparativo entre los diversos experimentos, puede dar muchos datos y explicar las situaciones dadas en tal periodo experimental.

En este estudio se llamará a tal concentración, concentración de sacarosa, aunque se tendrá en cuenta todo lo dicho anteriormente. Por tal motivo, la cinética del sustrato no se obtendrá mediante los resultados obtenidos sino que se hará mediante la bibliografía y otros experimentos ya realizados.

Se puede hacer la siguiente aclaración, en el instante inicial, la medición de tal parámetro, corresponde a la concentración de sacarosa inicial existente en el sustrato. Esto no deja de ser una aproximación.

Se han hecho siete experimentos, los cuales han transcurrido a diferentes condiciones de operación. En tales experimentos se ha estudiado la evolución del pH, que a su vez es controlado y fijado en un valor constante. También se ha estudiado la evolución de la concentración de nutrientes conforme avanzaba el proceso. La temperatura, la aireación, la adición de sustrato fresco y el reciclaje o no de las células han sido los parámetros variables de un experimento a otro. El tiempo también es un factor muy importante porque llegado a un instante determinado la fermentación se ve estancada, a causa de las altas concentraciones de alcohol en el medio, de la escasez de nutrientes y del crecimiento estacionario de las levaduras.



Fig. 9 Reactor de mezcla perfecta con aireación



Fig. 10 Reactor de mezcla perfecta sin aireación.

EXPERIMENTOS

A continuación se describen los experimentos desarrollados con sus condiciones y sus mediciones.

Experimento 1

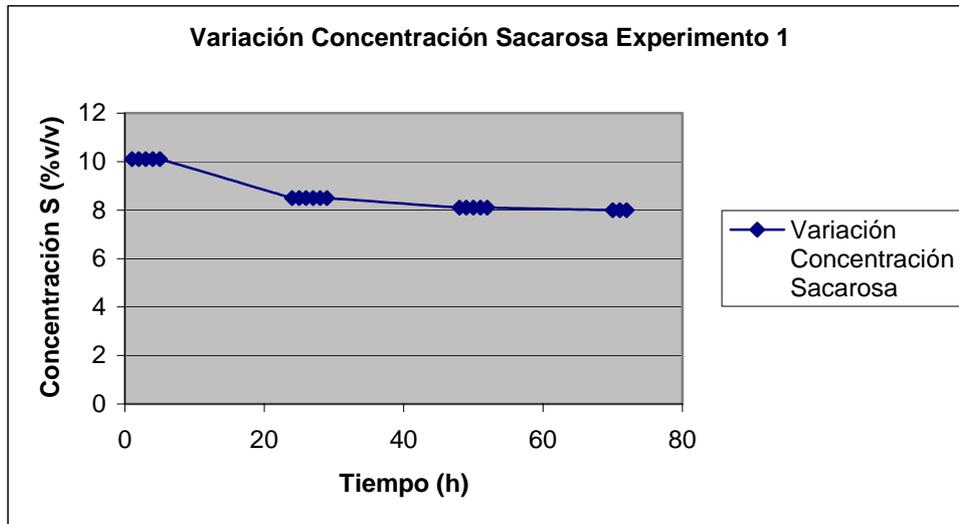
- Fecha: Comienzo: 28/12/05, Final: 30/12/05.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 35°C (controlado).
- Presión atmosférica
- Concentración inicial de sacarosa: 13'1% v/v.
- pH_{inicial}: 4,7 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1250 ml.
- Volumen de levadura en solución: 200 ml (correspondientes a 1,2 g levadura filtrada).
- Tiempo de aireación: 2 h de aire intenso.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄), en este caso no se añadió ningún nutriente adicional.

Mediciones

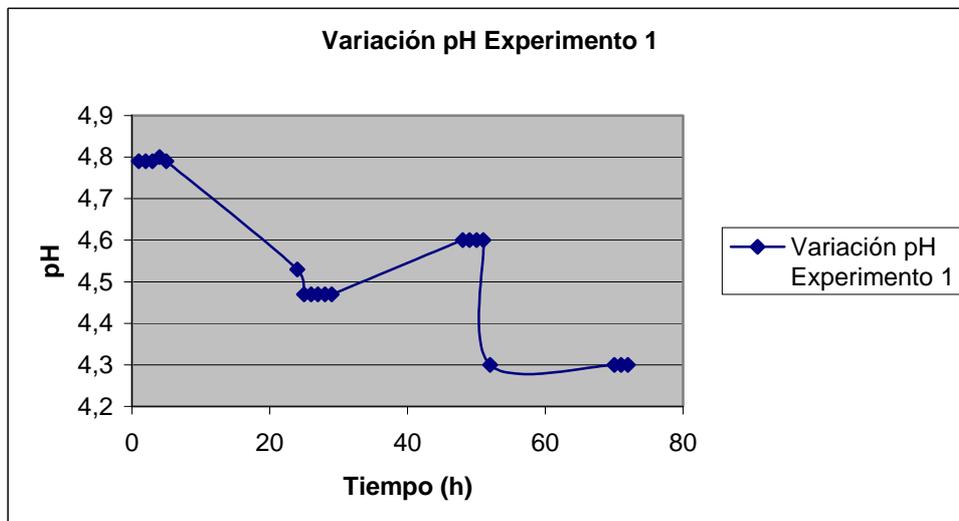
EXPERIMENTO 1 Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	10,1	4,79	125
2	10,1	4,79	125
3	10,1	4,79	0
4	10,1	4,80	0
5	10,1	4,79	0
24	8,5	4,53	0
25	8,5	4,47	0
26	8,5	4,47	0
27	8,5	4,47	0
28	8,5	4,47	0
29	8,5	4,47	0
48	8,1	4,60	0
49	8,1	4,60	0
50	8,1	4,60	0
51	8,1	4,60	0
52	8,1	4,30	0
70	8,0	4,30	0
71	8,0	4,30	0
72	8,0	4,30	0

Gráficos

Evolución del parámetro C_s frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Hay que indicar, que el pH se fue midiendo cada hora pero también se controlaba estableciendo su valor en un rango de valores tales como 4,6 – 4,7. Esto se consiguió adicionando ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

Experimento 2

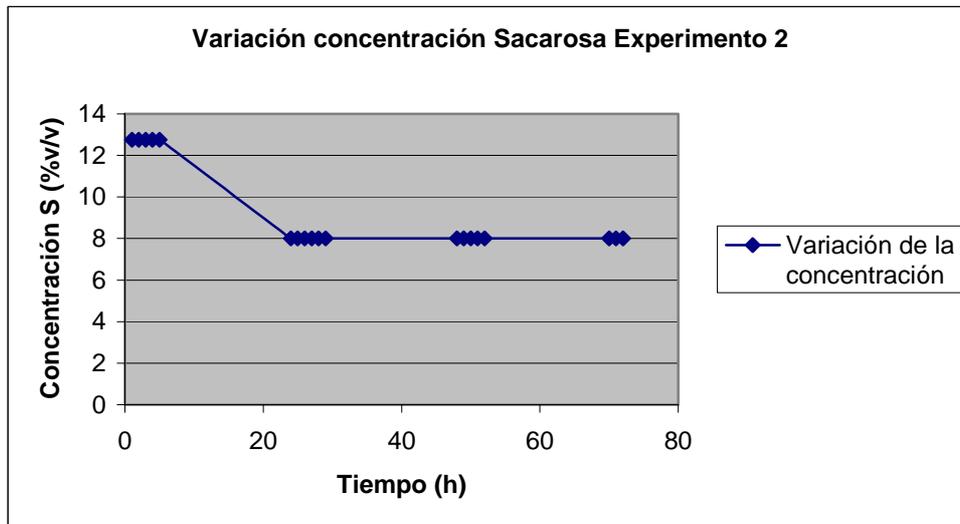
Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 03/01/06, Final: 06/01/06.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 35°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 13% v/v.
- pH_{inicial}: 4,6 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1250 ml.
- Volumen de levadura en solución: 1,5 g de levadura obtenida del primer experimento más 0,05 ml de levadura nueva disuelta en agua destilada.
- Tiempo de aireación: 10 h totales de aireación, intensa e intermedia.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄), no se adición ninguna sal.

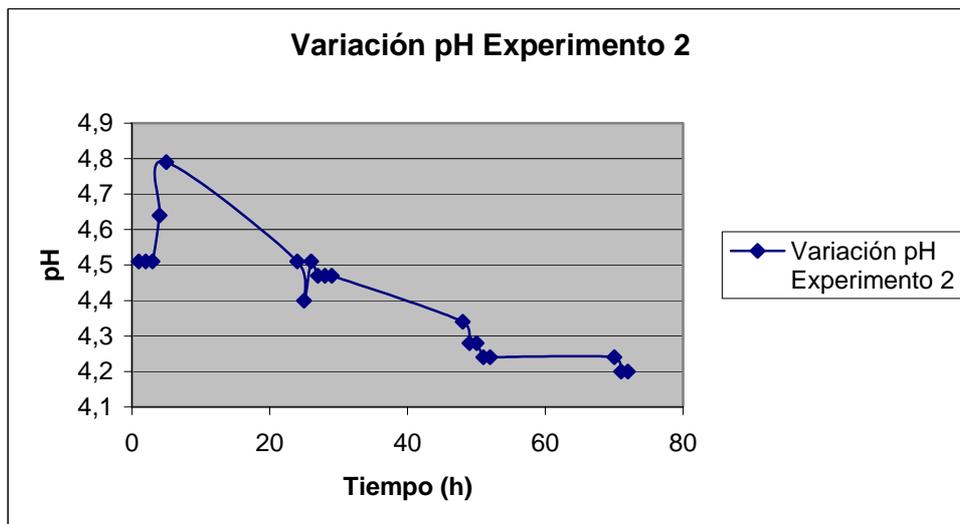
Mediciones

EXPERIMENTO 2			
Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	12,75	4,51	75
2	12,75	4,51	75
3	12,75	4,51	75
4	12,75	4,64	75
5	12,75	4,79	75
24	8,00	4,51	125
25	8,00	4,40	125
26	8,00	4,51	0
27	8,00	4,47	0
28	8,00	4,47	0
29	8,00	4,47	0
48	8,00	4,34	0
49	8,00	4,28	0
50	8,00	4,28	125
51	8,00	4,24	125
52	8,00	4,24	125
70	8,00	4,24	0
71	8,00	4,20	0
72	8,00	4,20	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 3

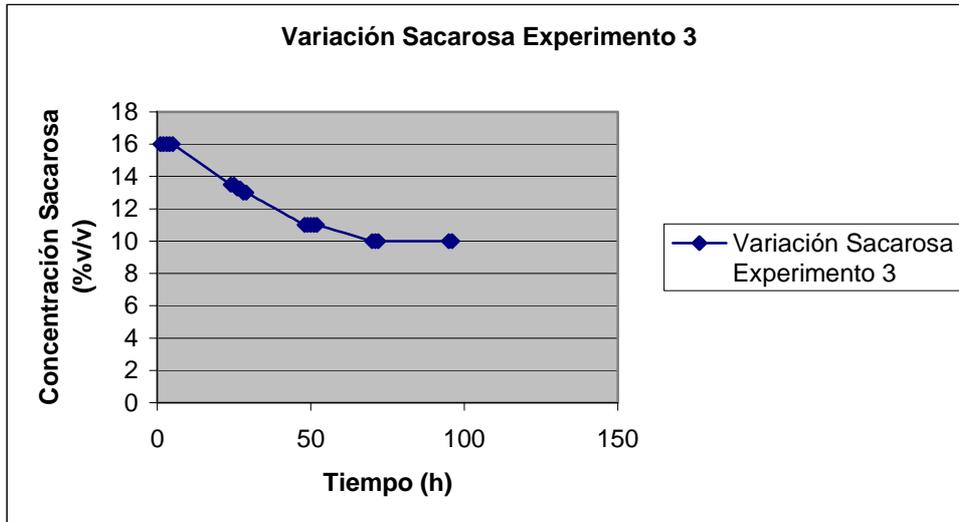
Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 09/01/06, Final: 13/01/06.
- Duración: 96 horas.
- Temperatura de operación: 33°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 18,1% v/v.
- pH_{inicial}: 4,06 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1100 ml.
- Volumen de levadura en solución: 250 ml levadura disuelta en sustrato. equivalente a 1,5 g de levadura seca.
- Tiempo de aireación: 2 h totales de aireación, intensa e intermedia.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄) = 4,2 g.

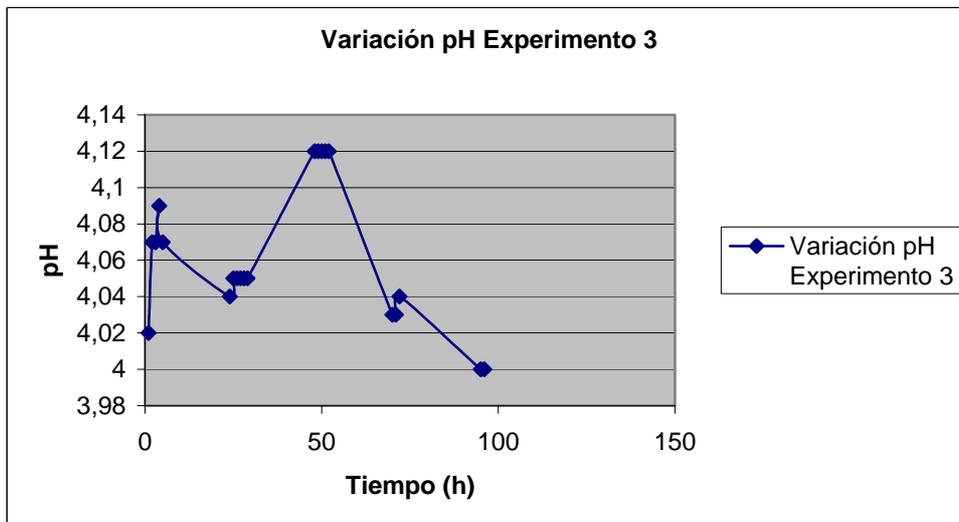
Mediciones

EXPERIMENTO 3			
Temperatura: 33°C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	16,00	4,02	125
2	16,00	4,07	50
3	16,00	4,07	0
4	16,00	4,09	0
5	16,00	4,07	0
24	13,50	4,04	0
25	13,50	4,05	0
26	13,25	4,05	0
27	13,25	4,05	0
28	13,00	4,05	0
29	13,00	4,05	0
48	11,00	4,12	0
49	11,00	4,12	0
50	11,00	4,12	0
51	11,00	4,12	0
52	11,00	4,12	0
70	10,00	4,03	0
71	10,00	4,03	0
72	10,00	4,04	0
95	10,00	4,00	0
96	10,00	4,00	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 4

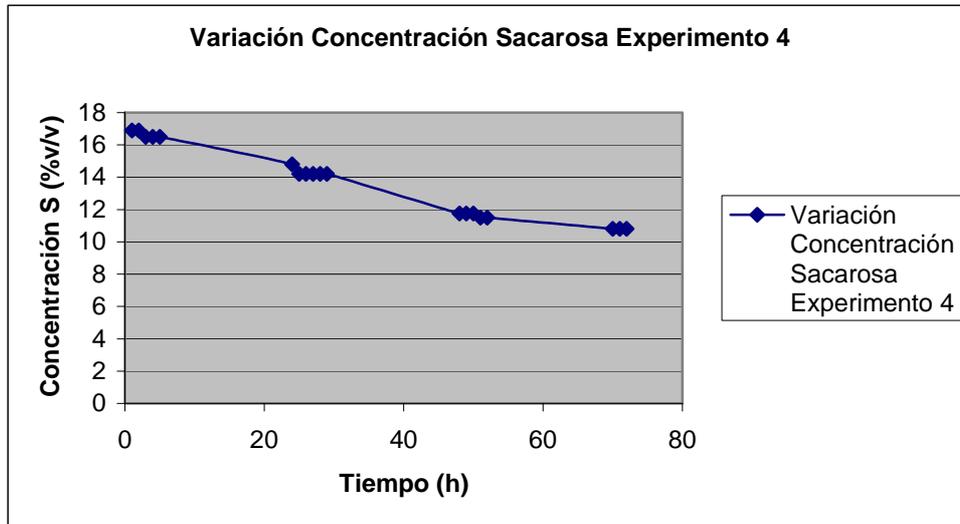
Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 17/01/06, Final: 22/01/06.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 25°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 18 % v/v.
- pH_{inicial}: 4,04 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1100 ml.
- Volumen de levadura en solución: 250 ml levadura disuelta en sustrato, equivalente a 1,5 g de levadura seca.
- Tiempo de aireación: 2 h totales de aireación, intensa e intermedia.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄) = 4,2 g.

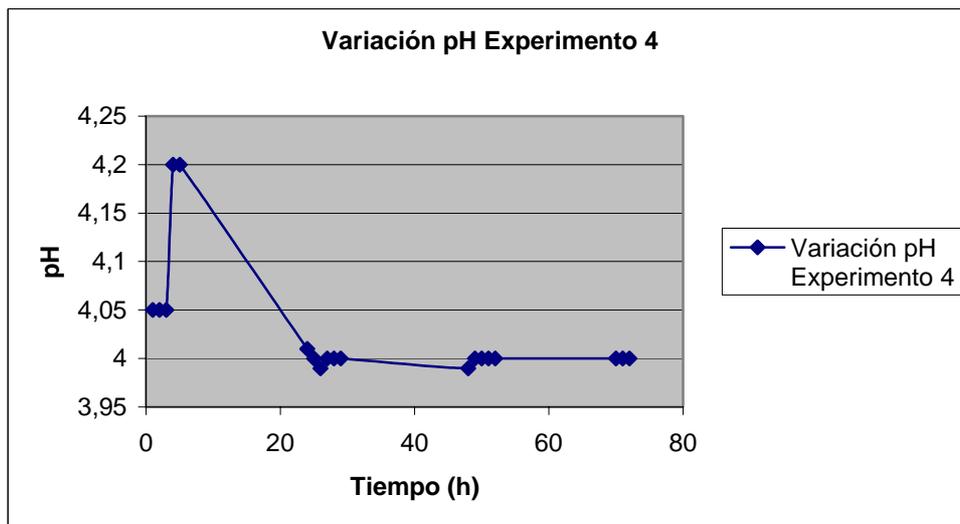
Mediciones

EXPERIMENTO 4			
Temperatura: 25 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	16,90	4,05	125
2	16,90	4,05	125
3	16,50	4,05	0
4	16,50	4,20	0
5	16,50	4,20	0
24	14,80	4,01	0
25	14,20	4,00	0
26	14,20	3,99	0
27	14,20	4,00	0
28	14,20	4,00	0
29	14,20	4,00	0
48	11,75	3,99	0
49	11,75	4,00	0
50	11,75	4,00	0
51	11,50	4,00	0
52	11,50	4,00	0
70	10,80	4,00	0
71	10,80	4,00	0
72	10,80	4,00	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 5

Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 23/01/06, Final: 27/01/06.
- Duración: 96 horas.
- Temperatura de operación: 35°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 20,5 % v/v.
- pH_{inicial}: 4,01 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1000 ml.
- Volumen de levadura en solución: 250 ml levadura disuelta en sustrato, equivalente a 1,5 g de levadura seca.
- Sin aireación. Se lleva a cabo sin aire para comprobar dos hechos importantes, el primero es que las levaduras son microanaeróbicas, es decir que pueden desarrollar su actividad en un medio con escaso oxígeno disuelto. Esto es beneficioso para la producción de bioetanol aunque también es perjudicial para el crecimiento de tales hongos. Y al ser menor la cantidad desarrollada de microorganismos serán menor la actividad total ejercida por estos dando lugar a menos alcohol. Además, también se quiere comprobar el efecto del aire en relación a la contaminación del sustrato.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄) = 4,2 g.

A este experimento le seguirá otro, que es su continuación. Éste se llamará 5' y se basará en la operación en semicontinuo del reactor. Al cabo de las 72 horas, la concentración de nutrientes del sustrato es baja. Ha disminuido desde un 21% aproximadamente hasta alrededor de un 13%. Transcurrido este tiempo se le añade al reactor 300 ml de sustrato fresco de concentración alta en azúcares. Previamente se le extrajo 250 ml de producto obtenido a los tres días de fermentación.

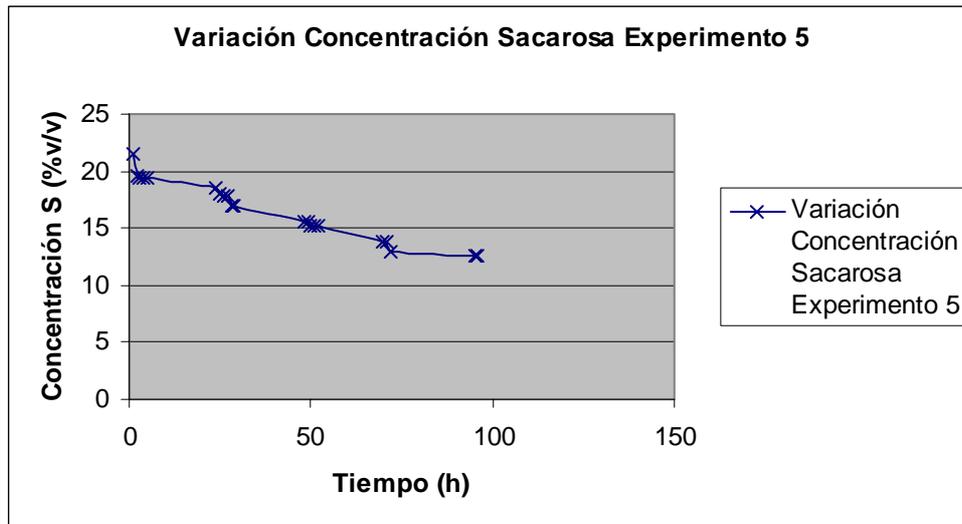
Las mediciones que se muestran en la siguiente tabla corresponden a la primera etapa donde se opera en continuo y se establece un tiempo de 72 horas para poder así comparar los resultados con los demás experimentos. Los 250 ml extraídos servirán para en futuro realizar las operaciones de decantación, filtración y destilación. Así se podrá saber la cantidad de alcohol obtenida de forma absoluta.

Después se continuará midiendo hasta llegar al cuarto día donde se parará el proceso y se hará el mismo procedimiento tomado para los demás casos. El tiempo total de los experimentos 5 y 5' es de 96 horas.

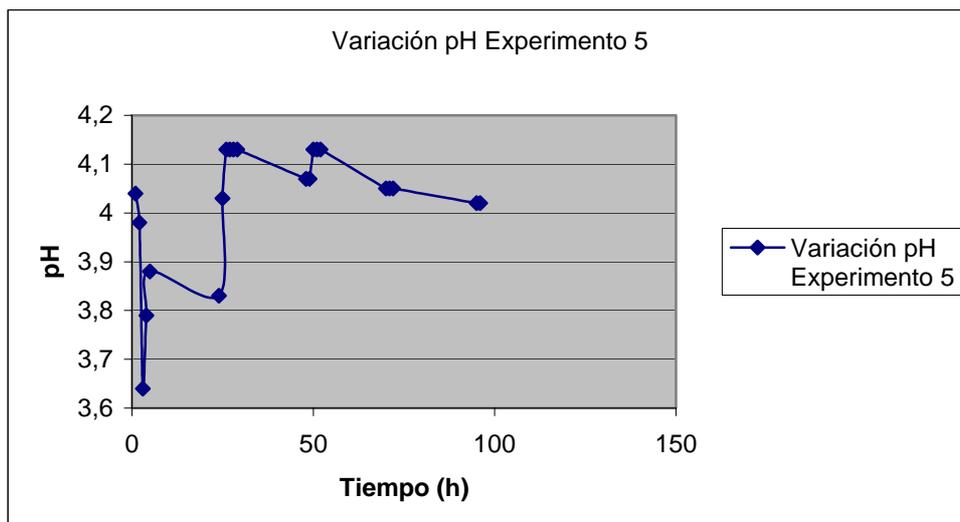
Mediciones

EXPERIMENTO 5 Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	21,50	4,04	0
2	19,60	3,98	0
3	19,35	3,64	0
4	19,35	3,79	0
5	19,35	3,88	0
24	18,50	3,83	0
25	18,00	4,03	0
26	17,75	4,13	0
27	17,75	4,13	0
28	17,00	4,13	0
29	17,00	4,13	0
48	15,50	4,07	0
49	15,50	4,07	0
50	15,25	4,13	0
51	15,25	4,13	0
52	15,25	4,13	0
70	13,75	4,05	0
71	13,75	4,05	0
72	13,00	4,05	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 5' (Continuación del anterior)

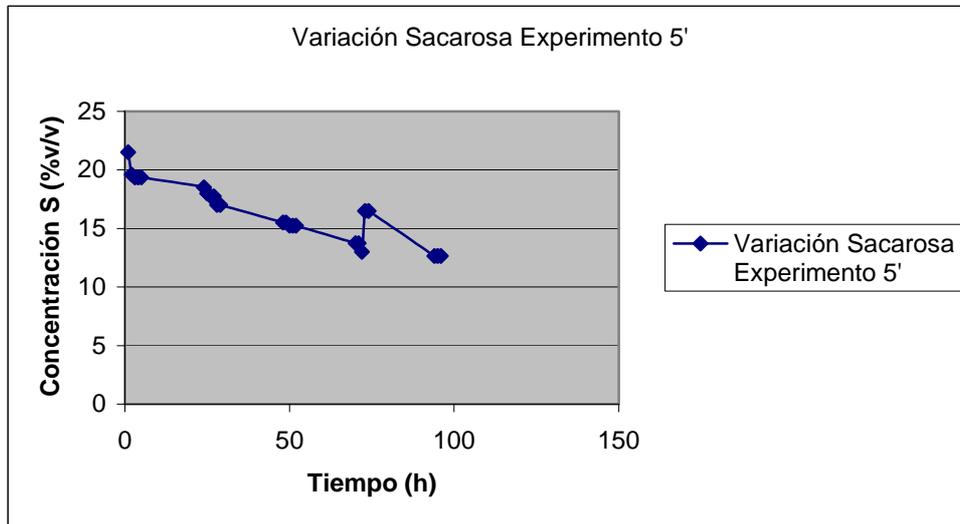
Fecha: Comienzo: 27/01/06, Final: 28/01/06

Mediciones

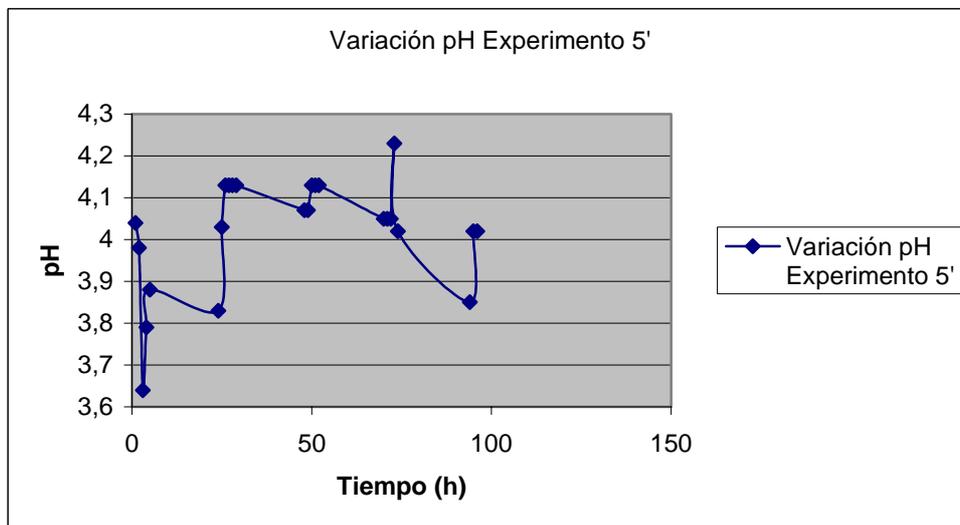
EXPERIMENTO 5' Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	21,5	4,04	0
2	19,6	3,98	0
3	19,35	3,64	0
4	19,35	3,79	0
5	19,35	3,88	0
24	18,5	3,83	0
25	18	4,03	0
26	17,75	4,13	0
27	17,75	4,13	0
28	17	4,13	0
29	17	4,13	0
48	15,5	4,07	0
49	15,5	4,07	0
50	15,25	4,13	0
51	15,25	4,13	0
52	15,25	4,13	0
70	13,75	4,05	0
71	13,75	4,05	0
72	13	4,05	0
73	16,5	4,23	0
74	16,5	4,02	0
94	12,65	3,85	0
95	12,65	4,02	0
96	12,65	4,02	0

Gráficos

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 6

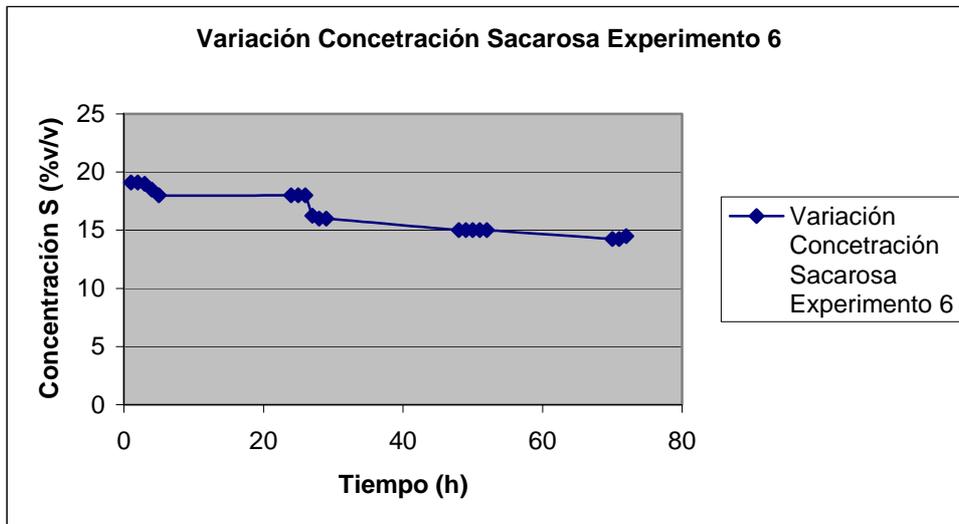
Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 01/02/06, Final: 04/01/06.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 30°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 18 % v/v.
- pH_{inicial}: 4,50 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1100 ml.
- Volumen de levadura en solución: 250 ml levadura disuelta en sustrato, equivalente a 1,5 g de levadura seca.
- Tiempo de aireación: 3 h totales de aireación, intensa e intermedia.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄) = 0,6 g.

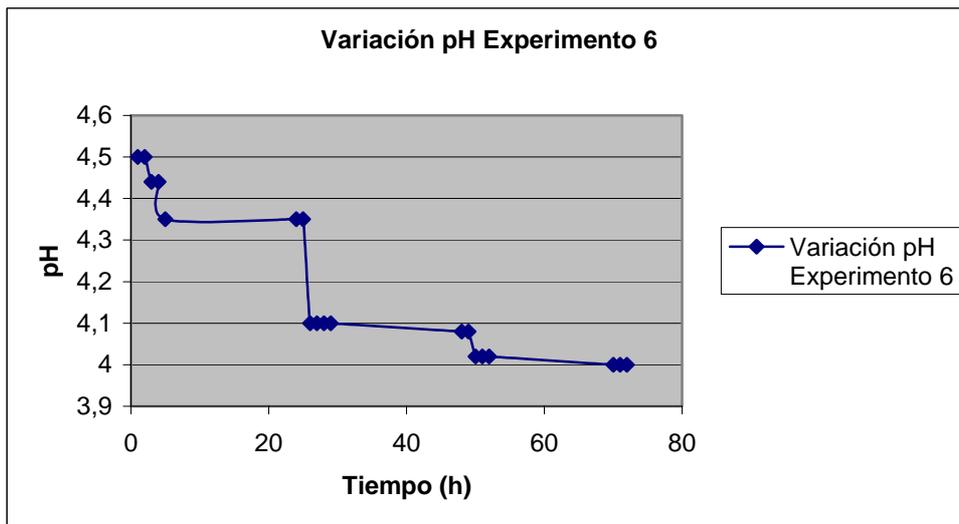
Mediciones

EXPERIMENTO 6			
Temperatura: 30 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	19,10	4,50	0
2	19,10	4,50	0
3	19,00	4,44	75
4	18,50	4,44	125
5	18,00	4,35	125
24	18,00	4,35	0
25	18,00	4,35	0
26	18,00	4,10	0
27	16,25	4,10	0
28	16,00	4,10	0
29	16,00	4,10	0
48	15,00	4,08	0
49	15,00	4,08	0
50	15,00	4,02	0
51	15,00	4,02	0
52	15,00	4,02	0
70	14,25	4,00	0
71	14,25	4,00	0
72	14,50	4,00	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



Experimento 7

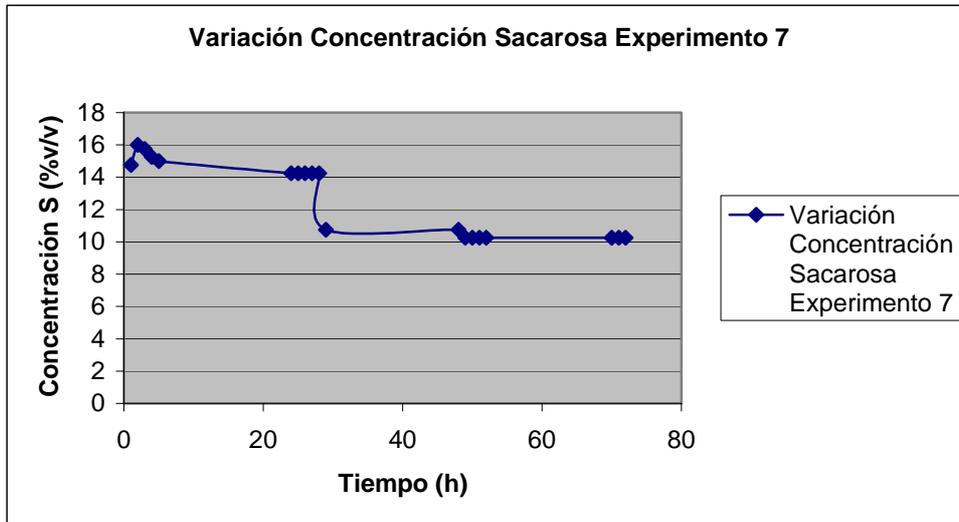
Condiciones de operación

- Fecha: Comienzo: 09/02/06, Final: 12/02/06.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 32°C (controlado).
- Presión atmosférica.
- Concentración inicial de sacarosa: 17 % v/v.
- pH_{inicial}: 4,00 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1200 ml.
- Volumen de levadura en solución: 200 ml levadura disuelta en sustrato, equivalente a 1,2 g de levadura seca.
- Tiempo de aireación: 3 h totales de aireación, intensa e intermedia.
- Agitación inicial = 88 rpm.
- Masa de nutrientes añadidos ((NH₃)₂HPO₄) = 4,2 g.

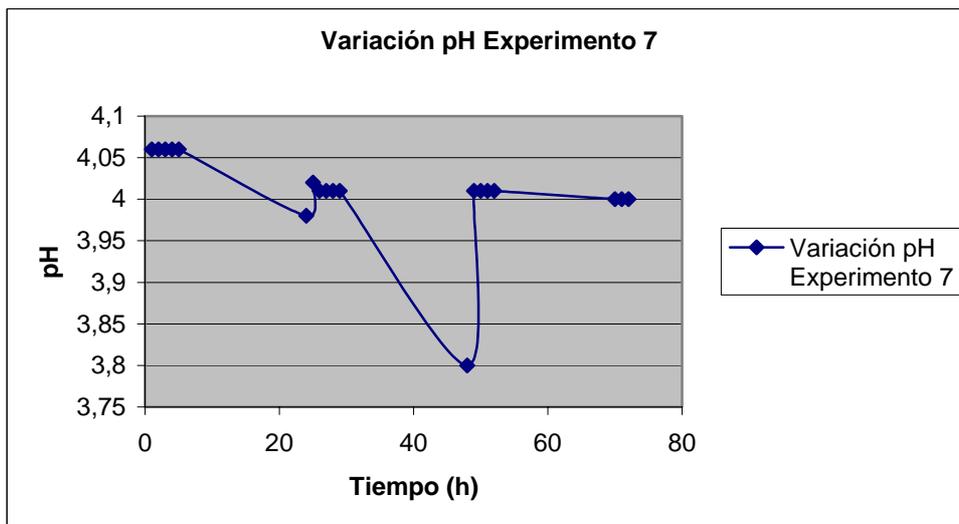
Mediciones

EXPERIMENTO 7 Temperatura: 32 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	14,75	4,06	0
2	16,00	4,06	0
3	15,75	4,06	0
4	15,25	4,06	0
5	15,00	4,06	0
24	14,25	3,98	75
25	14,25	4,02	75
26	14,25	4,01	75
27	14,25	4,01	0
28	14,25	4,01	0
29	10,75	4,01	0
48	10,75	3,80	0
49	10,25	4,01	0
50	10,25	4,01	0
51	10,25	4,01	0
52	10,25	4,01	0
70	10,25	4,00	0
71	10,25	4,00	0
72	10,25	4,00	0

Evolución del parámetro Cs frente al tiempo



Evolución del pH frente al tiempo



2.5 Decantación del producto obtenido

Después del proceso de fermentación, para cada experimento, se toma el total contenido del reactor y se introduce en una columna de una altura considerable donde se deja en reposo varios días. En estos días precipitan por gravedad los microorganismos y las demás sustancias de mayor densidad.

Después se separa la parte más densa del clarificado. Este último se deja de nuevo reposar durante varios días y se vuelve a repetir la operación.

El clarificado quedará exento de materiales sólidos, y será la alimentación del proceso de destilación. Las medidas del parámetro C_s en el clarificado, después de la separación de las dos fases, la densa y la ligera, son las que se presentan a continuación.

CLARIFICADOS		
Exp	Cs inicial (%v/v)	Cs final (%v/v)
1	13,10	10,00
2	13,00	8,00
3	18,10	11,25
4	18,00	11,50
5	20,50	12,25
5'	16,50	12,75
6	18,00	14,50
7	17,00	10,25



Fig. 11 Recogida del producto del reactor después del proceso

La fase densa se filtrará para así poder pesar la cantidad de materia sólida obtenida. Entre esta masa viscosa habrá microorganismos tales como la levadura, pero también otros extraños, además de la formación de un subproducto oscuro espeso. Pero todo esto se verá con mayor claridad en el apartado de filtración.

2.6 Separación del producto mediante una columna de destilación

La otra parte del proceso es la destilación del producto obtenido. Previamente, se deja decantar y así se retira la fase más densa, introduciendo el clarificado en la columna de destilación.

La columna de destilación consta de un hervidor, de una columna de rectificación, otra con una camisa para la refrigeración y condensación del etanol, de un serpentín a la salida de la misma también para refrigerar y un recipiente donde se recoge el destilado. También se tiene un termómetro a la salida de los gases de la columna de rectificación.



Fig. 12 Columna de destilación.

Mediante el control de la potencia del hervidor se puede conseguir mayor cantidad de destilado y a mayor concentración. Se ha de evitar llegar a los 100°C, ya que a esta temperatura se está destilando agua, y lo que se obtiene es un destilado con muy pequeña concentración de etanol. Por ello se ha de aplicar inicialmente una potencia alta pero cuando la temperatura se va aproximando a los 100°C ésta se ha de poner al mínimo y así evitar llegar a tal temperatura, que es la de ebullición del agua.

A través de este proceso se completa así la fase experimental, se obtiene el producto obtenido y se puede calcular el rendimiento global de cada experimento.

Aunque hay que tener en cuenta que la altura de la columna es baja y que su mecanismo es sencillo, es decir, que se obtendrán bajas concentraciones de alcohol.

A través de la medición del índice de refracción del destilado y utilizando las correlaciones precisas se obtiene la concentración de alcohol en % v/v y con ésta se puede hallar la cantidad de alcohol producida total para cada caso, sabiendo el volumen del cual se parte.

Para cada experimento se obtienen los datos expuestos en la tabla que se presenta a continuación, además también de contener los rendimientos de cada proceso.

La ecuación tomada para el cálculo del rendimiento del proceso global es la siguiente:

$$E = \frac{C_{et} \cdot V_D}{C_{S0} \cdot V_S} \cdot 100 \quad [1]$$

Siendo E la eficiencia del proceso global, V_D el volumen total de destilado resultante, V_S el volumen total inicial de sustrato utilizado, C_{et} la concentración de etanol en el destilado obtenido y C_{S0} es la concentración de sacarosa inicial contenida en el sustrato.

Mediante el uso de la ecuación [1] se calculan los rendimientos para cada experimento, estos quedan representados en la siguiente tabla.

DESTILACIÓN								
Exp	IR	V_S ml	C_{S0} %v	$V_{SacarosaInicial}$ ml	Etanol %v	V_D ml	V_{et} ml	Rendimiento %
1	1,3450	1250	13,1	163,8	25,75	135	34,76	21,23
2	1,3490	1250	13,0	162,5	33,75	100	33,75	20,77
3	1,3500	1100	18,1	199,1	35,75	125	44,69	22,45
4	1,3412	1100	18,0	198,0	18,25	320	58,40	29,49
5	1,3605	200	20,5	41,0	56,80	20	11,36	27,71
5'	1,3450	1000	16,5	165,0	25,75	275	70,81	42,92
6	1,3545	1100	18,0	198,0	44,75	180	80,55	40,68
7	1,3543	1200	17,0	204,0	44,25	125	55,31	27,11
0	1,3360	500	11,5	57,5	7,75	40	3,10	5,39

COLA		
$S_{inicial}$ %v	S_{cola} %v	V_{cola} ml
13,100	9,25	660
13,000	7,75	780
18,100	11,50	745
18,000	14,00	580
20,500	7,50	180
16,500	7,50	650
18,000	12,75	765
17,000	10,75	980
11,500	9,50	460

2.7 Filtración de la fase densa. Pesada de los microorganismos producidos

Se toman varios Erlenmeyer, y sobre cada boca de éstos se coloca un embudo donde reside un papel filtrante. Se introduce la fase densa, separada previamente del clarificado, y se deja en reposo durante 24 h.



Fig. 13 Filtrado de la fase densa del producto de reactor.

Cuando ha transcurrido este tiempo se puede ver que sobre el papel filtrante se ha depositado los posos del reactor. En esta masa viscosa que se obtiene, están presente las levaduras producidas, con un color claro que va adquiriendo tonos oscuros dados por otros subproductos del proceso, como puede ser el provocado por la reacción que dan el metabolismo de otros microorganismos sin interés industrial.



Fig. 14 Depósito de la masa sólida sobre el papel de filtro.

Contando con la posible contaminación, se pesó la materia sólida recogida para cada caso, y se obtuvieron los resultados de la tabla siguiente. Se ha tenido en cuenta que el papel de filtro pesaba un gramo antes de usar.

LEVADURA		
Exp	Masa g	Masa Ini g
1	3,7	1,2
2	8,5	1,5
3	5	1,5
4	5,3	1,5
5	0,9	1,5
5'	2	0
6	8,3	1,5
7	7,1	1,2
0	1,4	0

En esta tabla se puede ver un experimento que atiende al nombre de 0, este se refiere a la filtración de sustrato fresco, sin fermentar. Con él se quiere demostrar la generación de productos sólidos del proceso de fermentación ya que la masa depositada en el caso de tratarse de melaza meramente diluida, es muy pequeña.

Figuras 15, 16, 17 y 18

De las siguientes imágenes se puede ver en el centro de los filtrados correspondientes a los procesos de fermentación una capa más clara, ésta es la correspondiente a las levaduras. En la foto inferior derecha se ve la clara diferencia de depósitos producidos en los procesos de fermentación comparado con la mera filtración del sustrato sin ser sometido a la reacción.



Fig. 15 Filtrado del sustrato fresco.



Fig. 16 Levadura producida en el proceso en la parte central del papel.



Fig. 17 Levadura producida por fermentación mezclada con otros microorganismos extraños.



Fig. 18 Comparación de la masa filtrada entre los sustratos sometidos a la fermentación y el sustrato fresco.

2.8 Cálculos

Rendimiento

Para el cálculo del rendimiento del proceso global, como se vio anteriormente, se puede usar la siguiente ecuación:

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad [2]$$

La ecuación [2] es el rendimiento respecto del producto según el sustrato total consumido. Si se supone que inicialmente la disolución de melaza no contenía alcohol y además el sustrato se agota por completo, se llega a la ecuación [1] usada en el apartado 2.6.

Esta ecuación se ha aplicado para cada experimento. En la tabla siguiente se indican los diferentes rendimientos de operación. El rendimiento máximo obtenido está entorno al 42%. Según estas hipótesis realizadas la última concentración medida en el refractómetro, al cabo de 72 – 96 h, corresponde al alcohol formado.

Por otro lado, se podría pensar que no todo el sustrato es agotado, ya que al realizar la destilación y separar el alcohol del producto total sigue midiendo azúcares en el refractómetro. Según esto se podrían hallar otros valores de los rendimientos de cada experimento. Se ha de tener en cuenta que el refractómetro no es el instrumento más idóneo para medir azúcares en una disolución que también contiene alcohol. Además la columna de destilación no opera con un rendimiento del 100%.

En la siguiente tabla se tienen los resultados obtenidos.

RENDIMIENTO FORMACIÓN DE PRODUCTO						
Exp	V ₀ ml	S ₀ %v	V _{SacarosaInicial} ml	V _D ml	V _{TotalEtanol} ml	Y _{P/S}
1	1250	13,1	163,75	135	34,76	21,23
2	1250	13,0	162,50	100	33,75	20,77
3	1100	18,1	199,10	125	44,69	22,45
4	1100	18,0	198,00	320	58,40	29,50
5	200	20,5	41,00	20	11,36	27,71
5'	1000	16,5	165,00	275	70,81	42,92
6	1100	18,0	198,00	180	80,55	40,68
7	1200	17,0	204,00	125	55,31	27,11
0	500	11,5	57,50	40	3,10	5,39

El rendimiento del proceso también se puede calcular a través de la biomasa formada. Se puede observar la tabla del apartado 2.7. En ella aparece la masa filtrada en una disolución de melaza fresca, sin ser sometida a fermentación. Este peso medido puede ser restado a cada masa obtenida en los demás experimentos además de la levadura inicial introducida en alimentación, así se podrá calcular el rendimiento correspondiente a la generación de microorganismos respecto del sustrato consumido.

A través de la siguiente ecuación se obtienen tal rendimiento:

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Sin embargo, el hecho de suponer que gran parte de la masa filtrada sea levadura es un error grande ya que en el proceso las condiciones de esterilización son mínimas. Aunque por otra parte, la concentración de alcohol y la alta acidez del caldo eliminan las bacterias que puedan estar presentes.

Experimentalmente se encuentra la densidad de la melaza. Se toma una cierta cantidad, medida en gramos, de melaza. Ésta se disuelve en un litro de agua. Y se mide la concentración de sacarosa a través del refractómetro. Este último dará la concentración de azúcares en volumen. Como se sabe que la concentración de sacarosa en la melaza sin diluir es aproximadamente del 45% en peso, y se tiene la concentración de la melaza, se puede obtener la concentración de sacarosa.

Así se puede obtener la relación existente entre g/l de sacarosa y %v/v de sacarosa.

Esta sucesión de cálculos quedarían de la siguiente forma:

Experimento para hallar la relación entre concentraciones en peso y volumen de sacarosa

$$\frac{gMelaza}{lAgua} \cdot \% p / pSacarosa = \frac{gSacarosa}{lagua}$$

$$\frac{gMelaza}{gTotales} = \% p / pMelaza$$

Se pesan 423'5 gramos melaza en un recipiente de 2 litro de capacidad.

Se adiciona un litro de agua. Se pesa el total, corresponde a 1414,6 gramos totales.

Se supone que la concentración de sacarosa en la melaza sin diluir es del 45% en peso.

Con esto se tiene 190,575 gramos de sacarosa/litro de agua.

Mediante el refractómetro se obtiene la concentración de sacarosa en % en volumen. Ésta corresponde al 23'5%.

A través de este experimento se pueden pasar a masa las concentraciones en volúmenes de la sacarosa de los diferentes experimentos y aplicar la ecuación para el rendimiento en función del crecimiento celular generado respecto del sustrato consumido en masa.

A continuación se obtiene la tabla con los valores obtenidos.

RENDIMIENTO SEGÚN GENERACIÓN DE LEVADURA						
Exp	X _{final} g	X _{inicial} g	S _{inicial} %v	S g/l	V l	Y _{x/s}
1	3,7	1,2	13,1	106,24	1,25	1,88
2	8,5	1,5	13,0	105,43	1,25	5,31
3	5,0	1,5	18,1	146,79	1,10	2,17
4	5,3	1,5	18,0	145,98	1,10	2,37
5	2,0	1,5	20,5	166,26	0,20	1,50
5'	2,0	0,0	16,5	133,82	1,00	1,49
6	8,3	1,5	18,0	145,98	1,10	4,23
7	7,1	1,2	17,0	137,87	1,20	3,57
0	1,4	0,0	11,5	93,27	0,50	3,00

Es claro que en el experimento de mayor rendimiento en formación de producto, tendrá un valor mínimo en el rendimiento de producción de levadura, ya que el sustrato consumido se ha utilizado para la obtención de etanol y no para la fabricación de microorganismos.

El experimento 2 de un bajo rendimiento en la producción de etanol, alcanza el máximo rendimiento de elaboración de levadura.

El experimento 5 de mayor rendimiento en la producción de etanol, alcanza un rendimiento mínimo en la fabricación de levadura.

Todo esto indica que los cálculos efectuados son lógicos.

Cinética

Si se considera que la concentración de azúcares corresponde a la concentración de sacarosa en la disolución de melaza, se puede escribir la siguiente estequiometría de reacción:



A través de esta reacción se puede obtener la cantidad de alcohol formado en función del sustrato consumido, ya que se sabe la relación molar existente entre ambas sustancias. Por cada mol que reacciona de sacarosa se forman 4 moles de etanol. Se sabe la cantidad inicial y final de azúcares en la disolución de melaza. También se pueden hallar las masas moleculares de cada molécula, se tiene la siguiente ecuación:

$$P = \frac{S_0 - S}{PM(C_{12}H_{22}O_{11})} \cdot \frac{4 \text{ moles } CH_3CH_2OH}{1 \text{ mol } C_{12}H_{22}O_{11}} \cdot PM(CH_3CH_2OH)$$

Mediante esta relación se podría obtener la cantidad de alcohol teórica que se forma con el tiempo para cada experimento. Y se podría realizar una tabla donde por cada valor de concentración de azúcares medidos se tenga una concentración teórica de alcohol en la mezcla. Esta claro que esto no es del todo cierto pero al carecer de datos experimentales sobre

la evolución del etanol en el proceso, es preciso recurrir a tales valores para llegar a una cinética aproximada del producto de reacción.

Consumo de sustrato

Para la cinética del consumo de sustrato se puede utilizar la ecuación de Michaelis y Menten. La inversa de tal ecuación se representa y así se pueden hallar la constante de Michaelis y la velocidad máxima de consumo, o también llamada velocidad específica máxima. Además servirá para demostrar que tal ecuación se ajusta bien a la evolución del consumo de sustrato. Por otro lado, la velocidad de desaparición de sustrato se deberá obtener de diferenciar los valores medidos de azúcares respecto del tiempo.

Con todo esto se obtiene la ecuación cinética de consumo de sustrato en función de la concentración del sustrato.

$$-r_S = -\frac{dS}{dt} = \frac{(-r_S)_{m\acute{a}x} \cdot S}{k_m + S}$$

$$\frac{1}{-r_S} = \frac{k_m}{(-r_S)_{m\acute{a}x}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{(-r_S)_{m\acute{a}x}}$$

Formación de biomasa

Para modelar el crecimiento de la biomasa se utilizan las ecuaciones de Monod y su inversa. Estas ecuaciones sólo son aplicables al crecimiento exponencial. Mediante su representación se pueden obtener los datos de la velocidad de crecimiento máxima específica y de la constante de Monod. Finalmente, se halla la ecuación cinética de crecimiento celular función de la concentración del sustrato. La velocidad de aparición de biomasa se halla a través de la diferenciación de la biomasa respecto del tiempo.

En este caso, se carecen de datos para obtenerla.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{k_S + S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{k_S}{\mu_{m\acute{a}x}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Formación de producto

La velocidad de aparición de producto puede relacionarse con la velocidad de consumo de sustrato a través del rendimiento, que actuaría como una constante de proporcionalidad. De igual forma se puede relacionar con la velocidad de formación de biomasa, teniendo en cuenta que este caso el valor del rendimiento variaría ya que está referido a otras variables.

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{\frac{p}{s}} \frac{dS}{dt}$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{\frac{p}{x}} \frac{dX}{dt}$$

Balance de materia

Se puede realizar un balance de materia para cada experimento. Se sabe la reacción cinética y la estequiometría del proceso. A través de tal ecuación se puede obtener las relaciones molares entre los reactivos y los productos. Además se conocen las cantidades iniciales de los reactivos. Por otro lado se carece de datos sobre el dióxido de carbono producido. Sólo es claro que se puede hacer un balance de materia teórico pero no se puede comparar con el real, ya que no se tienen datos suficientes.



2.9 Observaciones experimentales

1. Evolución de la concentración S

Como ya se dijo anteriormente, el parámetro Cs no representa sólo la concentración de sacarosa, aunque en su gran mayoría sí, ya que en un principio es esta concentración la que lee el refractómetro. A medida que avanza la reacción de fermentación aumenta la concentración de alcohol y entonces la señal que indica el refractómetro al medir las muestras son una mezcla entre lo que lee por azúcares y por alcohol.

Como se puede observar de los gráficos, de la curva que representa la evolución de la concentración de sacarosa conforme avanza el tiempo se puede obtener los siguientes resultados.

- La concentración de azúcares disminuye conforme avanza la reacción. Hecho lógico, si se tiene en cuenta que los microorganismos se alimentan de los nutrientes para desarrollar sus funciones vitales y actividad catalizadora.
- Esta disminución es más rápida los primeros días. En el momento inicial, las levaduras se encuentran en su fase de crecimiento exponencial, pasado 48 h, éstas llegan a un crecimiento estacionario. Y a partir de las 72 horas, comienzan a degenerar.
- A partir del tercer día esta concentración se estabiliza llegando a su mínimo.
- Debido a errores de medida, como el uso del refractómetro, la concentración de alcohol aumenta la concentración total medida. Si se tuviese un cromatógrafo de líquidos calibrado para este caso a estudio, se podría ver cómo disminuye la concentración de azúcares respecto del tiempo, y también se podría comprobar la influencia del alcohol en el medio para el desarrollo de los microorganismos.
- A partir de una determinada concentración de alcohol, para un tiempo aproximado de 72 horas y una cierta cantidad de nutrientes, el proceso de reacción se estanca y se paraliza, haciendo que las levaduras lleguen a un estado estacionario y partiendo de éste, entren en la fase degenerativa. Cuando el medio se hace hostil, los seres microscópicos dejan de realizar correctamente sus funciones vitales, y la actividad de tales seres se ve en decremento.
- El alcohol y la escasez de nutrientes hacen disminuir la actividad de las levaduras. Esto se da cuando el proceso es avanzado, a partir de las 72 h.
- Existen factores que hacen disminuir el rendimiento del proceso, como por ejemplo la existencia de microorganismos ajenos, que luchan por el sustrato compitiendo con nuestros microorganismos de interés. También las impurezas causan el mismo efecto. Al coexistir diversas especies de microorganismos, compiten de forma feroz por el alimento, así que esto repercute directamente sobre el rendimiento del consumo de nutrientes.

Es decir, cuando los nutrientes que se consumen no se utilizan para sintetizar etanol o para el desarrollo de las *Saccharomyces*, entonces se está perdiendo eficacia, y por ello se reduce el rendimiento.

Se demuestra la contaminación a través del filtrado de la fase densa.

2. Evolución del pH conforme avanza el proceso

El pH es un factor que se ha ido controlando a lo largo del desarrollo de la reacción. Éste tiende a bajar con el paso del tiempo pero al ir controlándolo mediante la adición de ácido clorhídrico o hidróxido sódico, llega a estabilizarse más o menos bien.

Con esto se quiere decir, que la evolución de pH representada está condicionada por la cantidad de ácidos y bases añadidas.

El pH es un parámetro crucial ya que con él se crea un medio hostil para un gran abanico de microorganismos que harían disminuir de forma considerable el proceso. Y sin embargo permitiría vivir a los hongos que están habituados a medios ácidos.

La introducción de aire hace aumentar el pH a la vez que lo estabiliza, ya que en experimentos donde no se ha introducido aire, el pH varía de forma más evidente y tiende a valores más ácidos. El hecho de que el aire basifique el medio puede explicarse por el dióxido de carbono producido por el paso del aire a través del sustrato.

La aireación provoca la formación de espumas, en el caso a estudio, esta proliferación de espumas no es considerable, por ello no se ha adicionado antiespumantes.

En la fase experimental se hicieron varias pruebas que ponían de manifiesto el efecto producido por el aire.

Con el objetivo de observar la influencia del aire en el proceso, se han hecho diferentes experimentos donde se ha introducido en fases diferentes y se ha obtenido resultados distintos. En otros casos se ha evitado la introducción de aire.

En los experimentos 1, 3 y 4 se ha introducido un caudal de aire en la primera fase del proceso de fermentación. Este hecho tiene consecuencias beneficiosas y también perjudiciales. Al introducir aire en las primeras horas, promueve el desarrollo del crecimiento de las levaduras, así se proliferan antes y aprovechan las óptimas condiciones del sustrato. Ya que es en los primeros instantes cuando los nutrientes se encuentran en exceso. Pero el aire también hace aumentar el pH, además de introducir microorganismos que vengán arrastrados por él. Si consideramos que se ha utilizado una corriente de aire de alta calidad, como es el caso, sólo habría que tener en cuenta, que como consecuencia de hacer tender al sustrato a su neutralización esto puede originar una contaminación del medio ya que éste ha pasado de ser hostil a ser ideal para microorganismos extraños al proceso.

Como conclusión se podría decir que el efecto de la proliferación de levaduras causada por la aireación prematura es contrarrestado por el aumento del crecimiento de microorganismos contaminantes, que compiten por los nutrientes existentes con las levaduras encargadas de la fermentación, generándose así subproductos sin interés industrial.

Como se puede observar, la cantidad de microorganismos obtenidos de la filtración del producto más denso resultante del proceso, es bastante mayor que la obtenida para los experimentos en los cuales no se ha introducido aire, o se ha hecho pero en una fase más avanzada.

En el experimento 5 y 5' no se ha dado la aireación del sustrato, y se demuestra que la cantidad de depósitos recogidos de tal caso es mucho menor que para los demás experimentos. La masa filtrada es del orden de 4 veces menos que la media general de todos los casos. Además, el aspecto de este filtrado es de un color más claro. Esto indica que la cantidad de levaduras es mayor, ya que éstas dan este color marrón claro, mientras que impurezas, subproductos sólidos de reacción y otros microorganismos extraños oscurecen la producción de levadura convirtiendo el depósito sólido en marrón oscuro con tintes rojizos. En este proceso se evitó la introducción de aire para prevenir la contaminación e infección. Además también se quería probar que las condiciones microanaeróbicas son beneficiosas para la producción de etanol. Y esto se comprueba en el rendimiento global del proceso para el experimento 5'. Es el mayor de todos. Esto se puede deber a varios acontecimientos.

- Condiciones microanaeróbicas. La *Saccharomyces Cerevisiae* se desarrolla muy bien en tales medios y emplea mayor energía en la producción de alcohol que en su desarrollo propio.
- Una temperatura óptima. Los 35°C han hecho desarrollarse adecuadamente a las levaduras.
- Mínima contaminación. Al no introducir aire, las condiciones de esterilización marcadas al inicio se han mantenido durante todo el proceso y así se ha reducido el riesgo de contaminación por parte de microorganismos extraños a la fermentación.
- Operación en semicontinuo. El experimento 5' deriva del 5. Es decir, durante 72 horas se trabajó en discontinuo, con una concentración inicial de azúcares del 20,5%. Al cabo de este tiempo, cuando la concentración de sacarosa había bajado enormemente, se introdujo sustrato fresco en el reactor, y así se mejoró las condiciones nutritivas del medio, propiciando el aumento del rendimiento.
- Concentración inicial de sacarosa óptima, del 20,5%.

En este caso, se puede observar que la evolución del pH es más inestable, y así se demuestra, que el aire lo estabiliza. Además también se ve en la curva de pH frente al tiempo, que el pH baja más que en los demás experimentos, ya que como se dijo, el aire tiende a neutralizar el medio.

En el experimento 2 la aireación se ha realizado en dos fases del proceso, en la inicial y en la avanzada. Esto se dio así porque en este caso se usó microorganismos reciclados, es decir, que ya habían sido usados en un experimento anterior. Por ello su actividad se veía reducida, el aumento en horas de la aireación respecto de los demás casos se debe a que así se ayudaba a acelerar el crecimiento de las levaduras, y con él, la actividad de tales microorganismos.

3. Rendimiento

En este estudio, se trata de obtener la máxima cantidad de etanol posible.

Al realizarse diferentes experimentos con diversas condiciones de operación, se pueden observar cuales benefician la proliferación de células y las que propician la fabricación de alcohol.

Atendiendo a las tablas del punto 2.8 se puede ver que cuando las condiciones de proceso benefician el desarrollo del crecimiento de los microorganismos, estas mismas condiciones no son buenas para la producción de etanol, y viceversa.

Por eso, existen diferentes definiciones de rendimiento, las que se refieren al producto formado según el sustrato consumido, las que se refieren al crecimiento celular respecto al sustrato consumido y otras más.

2.10 Incidencias, errores, hipótesis aplicadas

Los errores más significativos cometidos en el desarrollo experimental están relacionados con las condiciones precarias de esterilización en las que se ha dado el proceso. Además del material de medida utilizado.

Con esto se quiere decir que se ha producido una contaminación inevitable, ya que se carecía de medios para realizar las tareas de laboratorio exentas de microorganismos extraños al proceso.

Se ha de tener en cuenta que la acidificación del sustrato y la propia producción de alcohol a medida que avanzaba el proceso ha reducido la contaminación.

De todas formas el rendimiento global disminuye por estas razones y también por la operación de separación.

La altura de la columna y su sencillez hacen reducir el rendimiento de tal operación.

El cálculo de la cinética de la reacción para el sustrato, el producto y la biomasa se hace imposible a causa de no tener el material necesario para realizar un seguimiento continuo de las variables tales como la concentración de cada sustancia.

Respecto a las hipótesis se considera que la concentración inicial medida en el refractómetro del sustrato se refiere absolutamente a la cantidad de sacarosa, es decir, que inicialmente en el sustrato no hay alcohol. Y esto se puede demostrar viendo la tabla correspondiente a la operación de destilado.

El experimento número 0 se refiere a la destilación de sustrato fresco. Y se puede comprobar que el volumen inicial de alcohol es muy bajo.

También se supondrá que la masa obtenida de la filtración corresponde a la levadura formada, considerando que la contaminación producida es contrarrestada por el efecto del alcohol y un pH bajo. Esto se usará para los balances de materia.

En el esquema 1 está representado el diseño de la operación en la laboratorio.