

1. MEMORIA JUSTIFICATIVA

1.1 Introducción

Este estudio trata sobre la producción de bioetanol a partir de un subproducto de la remolacha y la actividad metabólica de un tipo de hongo. Se pretende dar a conocer el uso de los reactores biológicos, la cinética de los organismos implicados, la evolución de las distintas variables, los diferentes sustratos posibles. En definitiva, el diseño de una planta piloto donde la producción de alcohol a través de la actividad de unos microorganismos concretos sea eficiente. Y para ello se aplica la biotecnología.

La biotecnología trata de unir los conocimientos científicos e ingenieriles y aplicarlos a procesos donde se ve involucrada la actividad de microorganismos y mediante su uso se obtienen bienes y servicios.

La biotecnología representa una integración de diferentes conocimientos y disciplinas científicas que abarcan la Bioquímica, la microbiología y la Ingeniería Química.

Esta disciplina utiliza agentes biológicos de distinta naturaleza, desde plantas o animales hasta microorganismos, células de tejidos animales o vegetales, enzimas, para obtener productos de utilidad en muy diversos campos, tales como el farmacéutico, médico, agrícola, ambiental, desarrollo de nuevos combustibles...

Las diferentes aplicaciones de la biotecnología van desde la obtención de antibióticos, ácidos orgánicos, alcoholes por procesos fermentativos hasta la depuración de aguas residuales. Y mediante la aplicación de la ingeniería genética se puede obtener la mejora de diferentes animales y plantas y hacer así más eficientes tales procesos.

La Ingeniería Bioquímica se centra en el desarrollo de tecnologías basadas en la utilización de catalizadores de origen biológico, aplicando los principios de la ingeniería química a tales procesos.

El ingeniero químico debe ocuparse tanto de las áreas a nivel molecular y celular como en la resolución de problemas en la producción de productos de interés industrial. Sus tareas comprenden los siguientes puntos:

- Mantenimiento y selección de biocatalizadores: enzimas, microorganismos o células animales o vegetales que tengan una actividad catalítica.
- Diseño y operación del sistema de reacción (reactores enzimáticos, biorreactores con biocatalizadores inmovilizados o libres, sistemas de cultivo celular, tiempo de aireación, potencia de agitación, condiciones de operación...)
- Desarrollo de sistemas de monitorización y control de procesos biotecnológicos.

- Diseño y operación de los procesos de recuperación y purificación de productos.
- Análisis y síntesis de procesos biotecnológicos.

Este proyecto se ha realizado para conseguir así un mayor campo de aplicación de los ingenieros químicos, ya que en los planes de la carrera de esta escuela no se tiene ninguna asignatura donde se trabaje de forma intensa con reactores biológicos y se diseñen tales procesos de operación.

1.2 Áreas de aplicación

El bioetanol se utiliza como sustitutivo de la gasolina, bien como único combustible o en mezclas. Por razones de miscibilidad entre ambos productos no se debe sobrepasar una concentración superior al 20% en volumen de etanol en la mezcla final.

El uso de mezclas, como la anteriormente especificada, no requiere cambios significativos en el motor del vehículo. Para ello el alcohol debe ser deshidratado a fin de eliminar los efectos indeseables del agua en la mezcla.

El empleo de etanol como único combustible debe realizarse en motores específicamente diseñados para tal biocombustible.

El bioetanol hace aumentar el octanaje de la gasolina y esto aumenta su calidad. Además al usar esta mezcla se está reduciendo el consumo de este combustible fósil, ya en peligro de extinción. Con el uso del bioetanol se comienza a valorizar los combustibles fósiles.

El bioetanol es una apuesta fuerte para el futuro de los combustibles. En capítulos posteriores se verá cómo influye este producto en muchos sectores, tanto económicos como sociales, medioambientales y científicos. Además se pueden reabrir las puertas a industrias obsoletas como las de la caña de azúcar, y así producir un aumento del producto interior bruto del país haciendo que este aumento no sea consecuencia directa de un aumento de la contaminación global sino todo lo contrario.

1.3 Antecedentes

En este apartado se ha realizado una búsqueda de los diferentes proyectos presentados en la escuela relacionados con este tema en cuestión.

Realmente, no existe proyecto de semejanza con éste, pero sí hay algunos que tratan el diseño de tanques de fermentación para la producción de la cerveza y su posterior almacenamiento. Este proyecto se hace llamar “Diseño de tanques de fermentación y guarda de 6000 hl de capacidad para una fábrica de cerveza”. Fue realizado en el 1998.

Existe otro que se titula de la siguiente forma “Planta para la obtención de azúcar de orujo por el método continuo de extracción y posterior fermentación dirigida para su conversión den alcohol”. Realizado en 1980

1.4 Objetivos

Este proyecto tiene varios objetivos, el primero y fundamental es el estudio de la evolución de los diferentes parámetros que afectan al proceso de producción de bioetanol. Para ello se centra en un periodo largo de experimentación donde se realizan diferentes experimentos y así se comparan los resultados con las predicciones teóricas previamente desarrolladas. Otra meta es el diseño de una planta de producción de bioetanol en base a tal fase experimental.

Y como objetivo intrínseco a todo esto, se hace una introducción al mundo de la biotecnología, la microbiología, los biocombustibles y al funcionamiento de los biorreactores.

De manera más concreta se recogen en los siguientes puntos los objetivos marcados:

- Comprender el proceso de fermentación y todos los aspectos relacionados con él.
- Conocer de manera precisa el proceso de fermentación de melaza de remolacha empleando *Saccharomyces Cerevisiae* como microorganismo, y controlar así las variables del proceso.
- Obtener etanol mediante el proceso de separación a partir de la fermentación.
- Analizar los factores que afectan al proceso en cuanto al rendimiento y duración.
- Diseño de una planta piloto de producción de etanol.

1.5 Metodología experimental

El procedimiento experimental consta de varias fases, la primera trata el diseño de experimentos, la segunda en la operación con el reactor y la tercera se refiere al proceso de separación, es decir, la destilación, la cuarta es la metodología llevada a cabo para la siembra y cultivo de los microorganismos.

En la primera se diseñan diversos experimentos donde se establecen valores diferentes a las variables para poder así descubrir el caso más óptimo y la influencia de éstas en el proceso.

La segunda fase es la de la reacción, se hace un estudio del funcionamiento del reactor y mediante la medición de los parámetros precisos y se halla la evolución de las variables fundamentales, y con esto se saca un rendimiento del reactor y la cinética para cada caso.

En la tercera se prepara una columna sencilla de destilación y mediante ésta se separa el producto, etanol, del producto final del reactor. Así se puede obtener el rendimiento global del proceso. Además de sacar el rendimiento de la propia columna.

Entre estas fases aparecen otras actividades como la siembra. Mantenimiento y cultivo de las levaduras. El procedimiento de la esterilización, la preparación del sustrato...

La fase experimental es lo más importante del proyecto ya que este último se basa en ella y así se comparan los análisis teóricos con los prácticos. Con todo ello se llega al diseño de una planta piloto de producción de etanol.

1.6 Resumen del proyecto

Este proyecto consta de cinco capítulos que describen el desarrollo de la fase experimental, la aplicación de ésta al diseño de una planta de producción de etanol, conclusiones generales y futuras líneas de investigación. Además se incorporan una serie de anexos donde se desarrollan conceptos generales y específicos del proceso en cuestión.

El primer capítulo es la presente Memoria Justificativa, a modo de introducción del propio proyecto, se explica el área de aplicación de tales operaciones, se definen conceptos fundamentales para la comprensión del estudio, se marcan los objetivos y se pone de manifiesto la metodología seguida en la fase experimental. También se buscan antecedentes a este estudio, los cuales nos pueden ayudar para la comprensión y mejora de lo ya existente.

El segundo capítulo se refiere al periodo experimental. Es el más importante ya que en él está basado todo el estudio. Se realiza una descripción de los experimentos llevados a cabo, del procedimiento seguido para la siembra de la levadura, la esterilización del sustrato, la preparación de este mismo. Además de definir las condiciones y el modo de operación. A través de este apartado se obtienen las conclusiones básicas para poder realizar el diseño de una planta piloto de producción de etanol.

En la fase experimental se realizan una serie de experimentos para poder así llegar a conocer cuáles son las condiciones óptimas del proceso. Además se desarrolla el modo de conseguir sustrato, levaduras, el mantenimiento de éstas, el modo de operación y la instrumentación necesaria para realizar tales experimentos con un rigor considerable.

Se ha usado un tanque de dos litros de capacidad, el sistema de agitación procura una mezcla perfecta. Este reactor tiene la posibilidad de aireación.

El producto obtenido se ha llevado a una sencilla columna de destilación. De aquí se separa el etanol y se obtiene la cantidad total producida en cada experimento, dependiendo ésta del rendimiento de conversión de cada estudio empírico.

Además en la fase experimental se comprueban que las predicciones teóricas coinciden con los resultados de los experimentos.

En el tercer capítulo se recoge el diseño básico de una planta piloto de producción de etanol. Éste se basa en una cinética de reacción sencilla como la de Monod para el crecimiento celular.

En el diseño de la planta piloto, se usan los datos empíricos obtenidos en el capítulo anterior y diferentes datos tabulados para llegar así a un boceto de lo que sería una planta piloto para la producción de etanol. Aquí se diseñan el modo del proceso, los tipos de tanques y su disposición, la capacidad de éstos, la velocidad de dilución, las variables de operación, el sistema de agitación y de aireación y su potencia y caudal respectivamente.

En los capítulos 4 y 5 se establecen unas conclusiones finales y unas futuras investigaciones que puedan mejorar lo realizado. Estas conclusiones se refieren tanto a

las condiciones de operación, a los resultados, al diseño de la planta como al modo de operar para la obtención de bioetanol.

Sobre las futuras líneas de investigación se puede decir, resumidamente, que mejorando las condiciones de esterilización, usando un método de separación más eficiente, utilizando biocatalizadores inmovilizados y recirculando la corriente de salida, se puede mejorar considerablemente el rendimiento global del proceso.

Aparte de estos cinco capítulos se tiene un anexo donde se explican conceptos fundamentales para entender todo el proceso que este proyecto presenta.

El anexo 1 se refiere a las nuevas tecnologías que se están desarrollando en el campo de la investigación de los combustibles alternativos. De una forma general se hace un repaso a tales investigaciones que se están dando en toda Europa. También se define cada tecnología y cada combustible. Se explica el porqué de la búsqueda insistente de un nuevo combustible.

El carburante ideal debe cumplir una serie de características que hace prácticamente imposible llegar a su encuentro. Por un lado se busca una independencia del exterior, es decir, Europa pretende el desarrollo de una tecnología capaz de autoabastecerla. Por otro, se quiere reducir la emisión de los gases de invernadero y cumplir así con el acuerdo de Kyoto.

El carburante que sustituya a la gasolina o al gasoil debe tener las ventajas de éstos y no sus inconvenientes. Debe dar una autonomía al vehículo considerable, una seguridad aceptable y una disponibilidad adecuada. Es decir, se debe llegar a una infraestructura tal como la del mercado de los combustibles tradicionales.

Los biocarburantes son la alternativa más al alcance entre muchas.

Por un lado se encuentra el hidrógeno, que sería el combustible idóneo, por su ausencia de dióxido de carbono en su combustión. Además tiene una gran capacidad de almacenar energía. Pero no se dispone de la tecnología necesaria para reducir los costes de inversión. Además su generación se hace a través del uso de otra energía y ésta no debe nunca emitir gases de efecto invernadero ya que entonces no se solucionaría el problema.

El anexo 2 ahonda más en el propio tema de interés, el bioetanol. Se intenta explicar en éste las características generales y más específicas, sus diferentes usos y su presencia en diversos países.

El bioetanol es llamado bioetanol porque su síntesis se hace a través de las reacciones biológicas. Se considera un combustible alternativo porque reduce la emisión de gases de efecto invernadero y además también disminuye el consumo de gasolina.

Por otro lado se ve como una alternativa viable ya que la inversión inicial no es muy costosa porque se puede aprovechar el motor de la gasolina y la infraestructura de abastecimiento existentes para potenciar el mercado de este tipo de combustible.

El anexo 3 define el proceso de fermentación, las variables por el cual se rige, los fenómenos a tener en cuenta. Y se hace un esquema del proceso a escala laboratorio y a escala industrial.

La fermentación es un proceso que realizan muchos microorganismos, efectuando reacciones sobre algunos compuestos orgánicos y liberando energía. Sólo en condiciones fermentativas se da la oxidación parcial de los átomos de carbono del compuesto orgánico y una pequeña cantidad de la energía potencial disponible se libera.

Los anexos 4 y 5 tratan de los microorganismos y del sustrato. De su elección y de sus características.

El trabajo con microorganismos hace más difícil el control del proceso. Se debe procurar un buen alimento para obtener grandes conversiones de los azúcares en etanol.

Los microorganismos utilizados son hongos, levaduras de la especie *Saccharomyces* y de la clase *Cerevisiae*. Ésta fue obtenida de la facultad de biología. Estaba conservada a -72 °C con nitrógeno líquido. Para su reanimación se introdujo durante 48 horas en una estufa a 32 °C sobre un sustrato sólido llamado YPD.

En estos anexos se explica cómo se obtienen las colonias de una cepa, como se mantienen y como se desarrolla su crecimiento.

Para ello se ha de elaborar un caldo de cultivo idóneo para conseguir los objetivos marcados.

Este caldo debe tener una serie de macro y micronutrientes tales que propicien la buena actividad de las células. Esto se consigue adicionando en su justa medida algunos elementos, tales como el nitrógeno, el fósforo, algunas vitaminas,...

El anexo 6 deja paso a la cinética. La cinética de la biomasa, del producto y del sustrato. Aquí se desarrollan las ecuaciones y los modelos que se aplican a estos tipos de procesos.

El anexo 7 muestra las diversas formas de operar con un mismo reactor, el de tanque agitado. Además se hace una breve descripción de las nuevas tecnologías aplicadas al desarrollo de innovadores reactores donde el rendimiento se hace mucho mayor, pero también incrementan los costos de inversión.

El modo de operar es muy importante y condiciona las variables de operación. El uso de un modo u otro depende del objetivo del proceso y de la escala a la cual se está trabajando.

Por un lado están los reactores de mezcla perfecta y los de flujo en pistón. Dentro de cada modalidad existen diversas formas trabajo, en continuo, discontinuo, semicontinuo. La disposición de los reactores puede ser en serie, trabajando con recirculación. El uso de biocatalizadores inmovilizados, libres...

Existen infinitudes de combinaciones, cada una de ellas con ventajas e inconvenientes. La elección de tales dependerá de las condiciones del proceso, del producto final a producir y de un conveniente análisis de costes.

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 esterilizados, 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

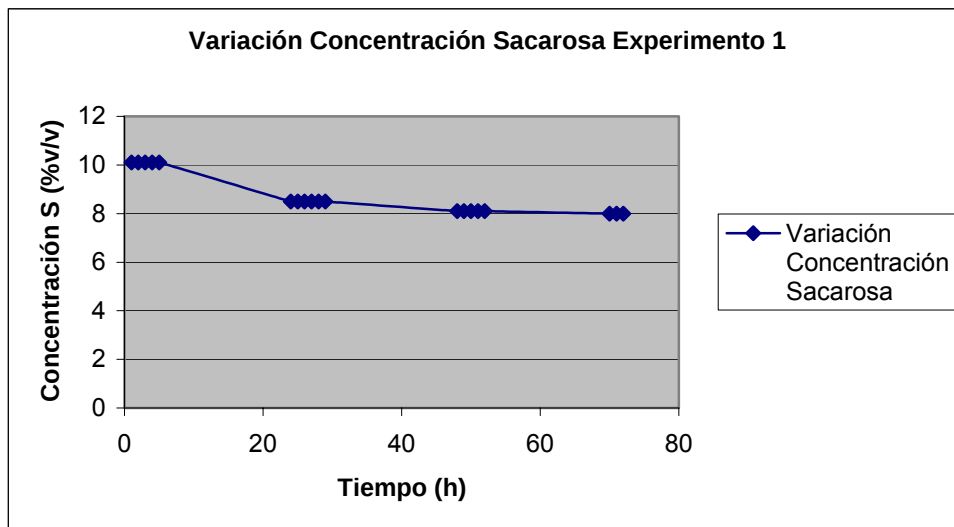
- Fecha: Comienzo: 28/12/05, Final: 30/12/05.
- Duración: 72 horas.
- Temperatura de operación: 35°C (controlado).
- Presión atmosférica
- Concentración inicial de sacarosa: 13'1%v/v.
- pH_{inicial}: 4,7 (controlado).
- Volumen de sustrato: 1250 ml.
- Volumen de levadura en solución: 200 ml (correspondientes 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

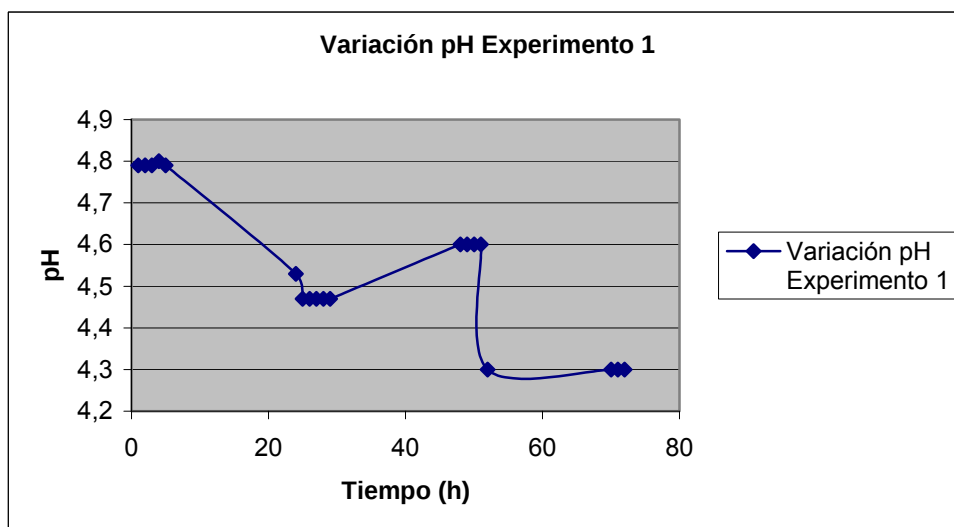
EXPERIMENTO 1 Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	10,1	4,79	125
2	10,1	4,79	125
3	10,1	4,79	0
4	10,1	4,80	0
5	10,1	4,79	0
24	8,5	4,53	0
25	8,5	4,47	0
26	8,5	4,47	0
27	8,5	4,47	0
28	8,5	4,47	0
29	8,5	4,47	0
48	8,1	4,60	0
49	8,1	4,60	0
50	8,1	4,60	0
51	8,1	4,60	0
52	8,1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

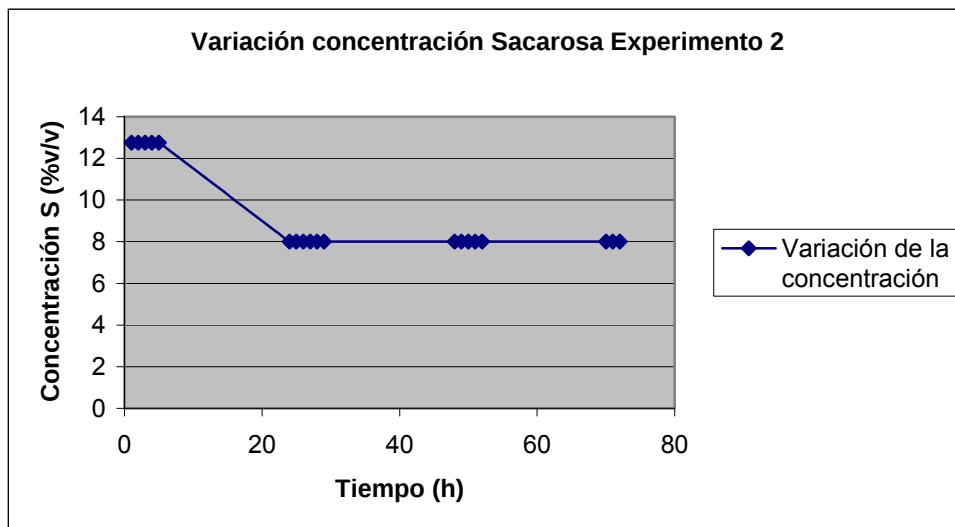
Condiciones de operación

- 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.

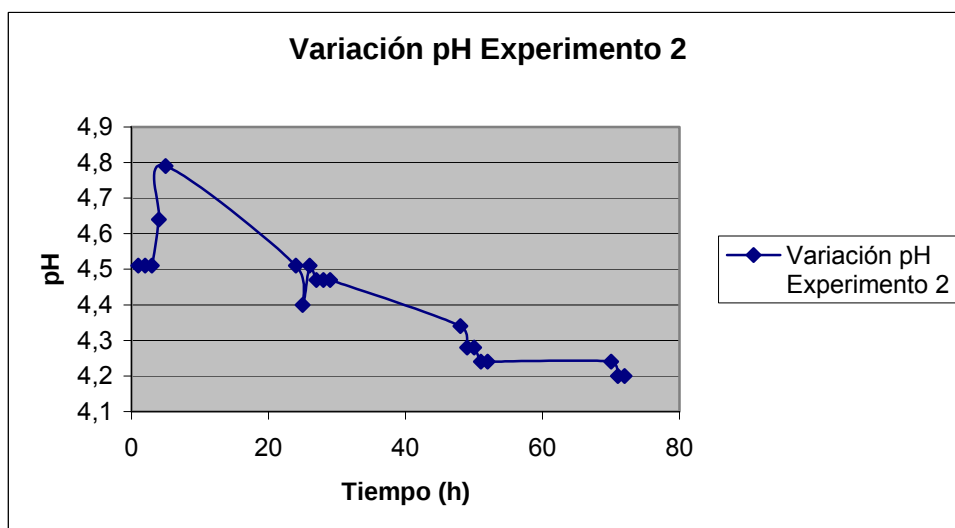
Mediciones

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

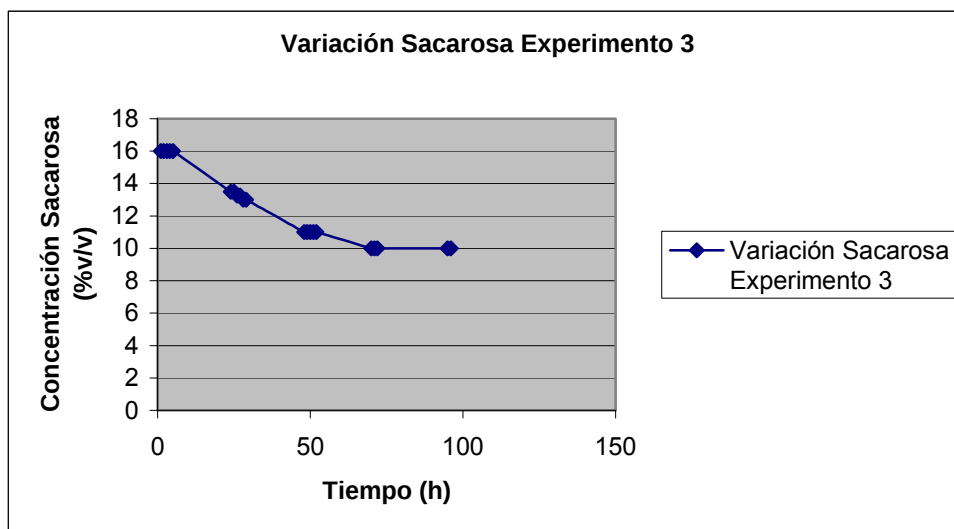
Condiciones de operación

- 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 $((\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4) = 4,2 \text{ g}$.

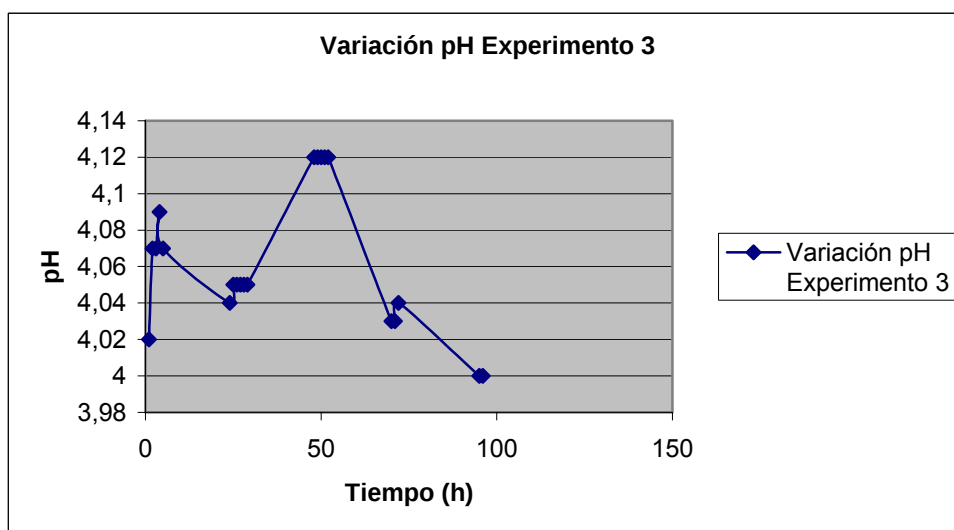
Mediciones

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

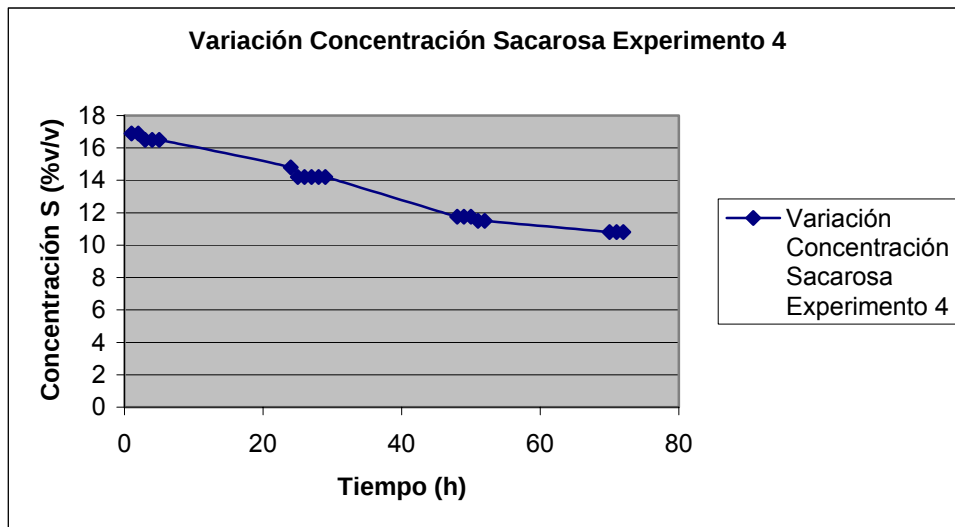
Condiciones de operación

- 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 $((\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4) = 4,2 \text{ g}$.

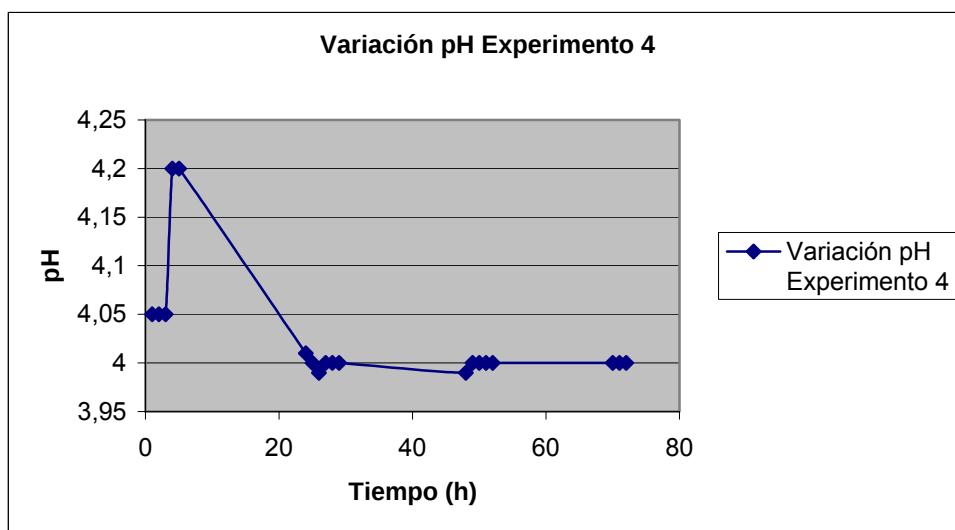
Mediciones

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 $((\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4) = 4,2 \text{ g}$.

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.

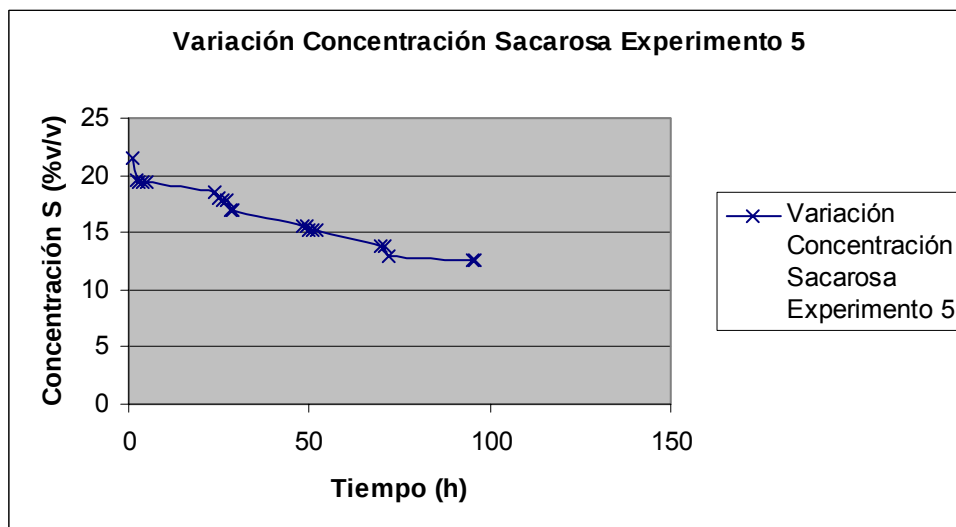
Las mediciones que se muestran en la siguiente tabla corresponden a la primera etapa donde se opera en continuo y se establece un tiempo de 72 horas para poder así comparar los resultados con los demás experimentos. Los 250 ml extraídos servirán para en futuro realizar las operaciones de decantación,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

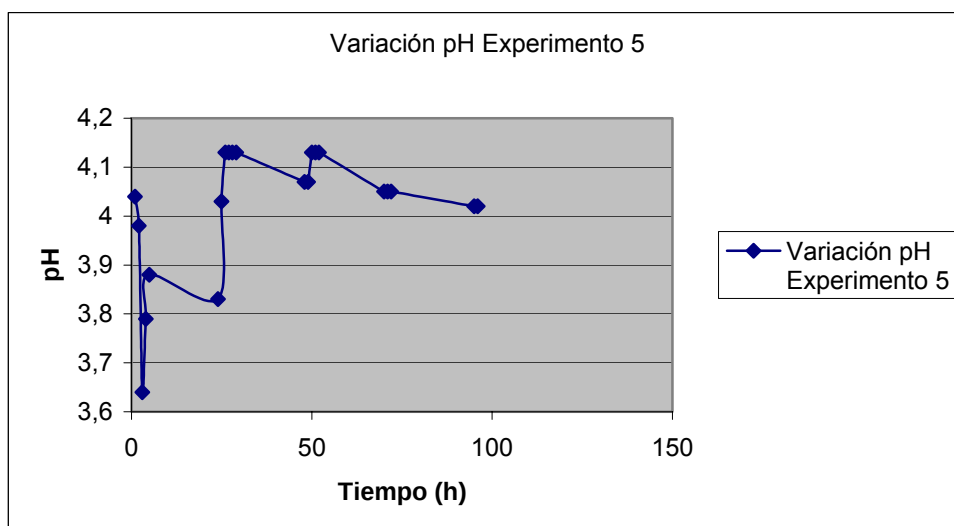
Mediciones

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)

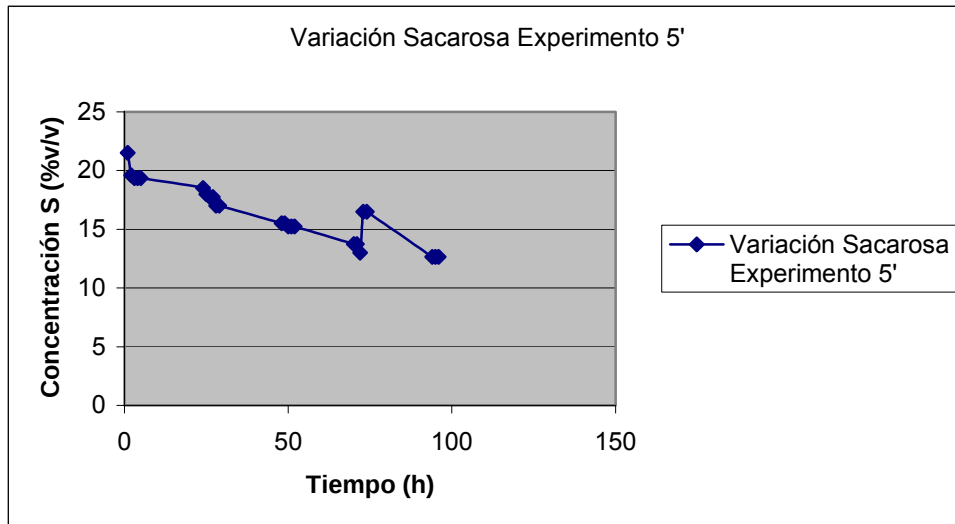
Fecha: Comienzo: 27/01/06, Final: 28/01/06

Mediciones

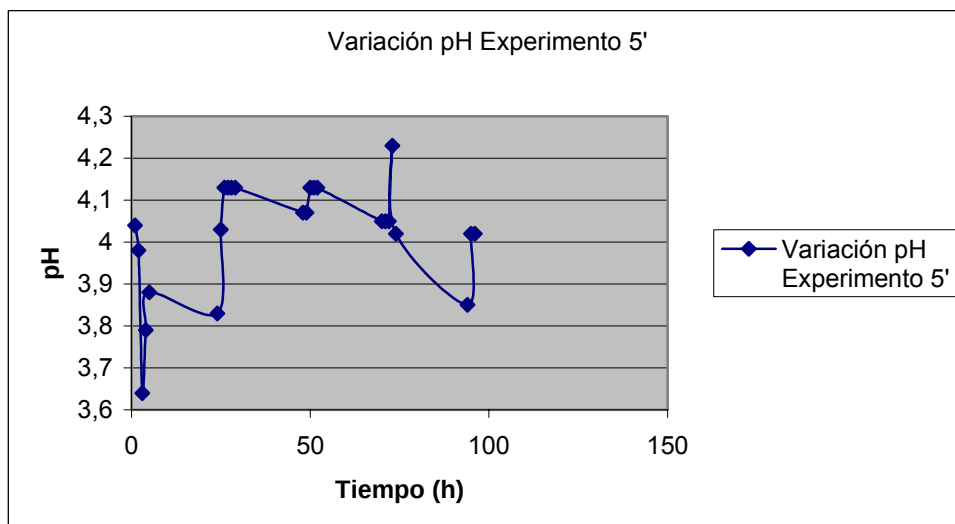
EXPERIMENTO 5'			
Temperatura: 35 °C			
Tiempo (h)	C (%)	pH	Caudal de aire (cc/min)
1	21,5	4,04	0
2	19,6	3,98	0
3	19,35	3,64	0
4	19,35	3,79	0
5	19,35	3,88	0
24	18,5	3,83	0
25	18	4,03	0
26	17,75	4,13	0
27	17,75	4,13	0
28	17	4,13	0
29	17	4,13	0
48	15,5	4,07	0
49	15,5	4,07	0
50	15,25	4,13	0
51	15,25	4,13	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

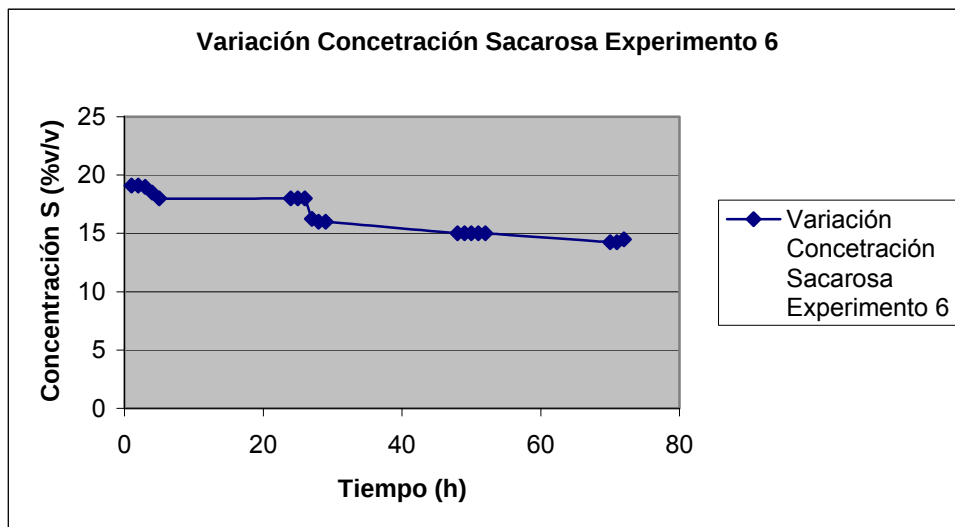
Condiciones de operación

- 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.

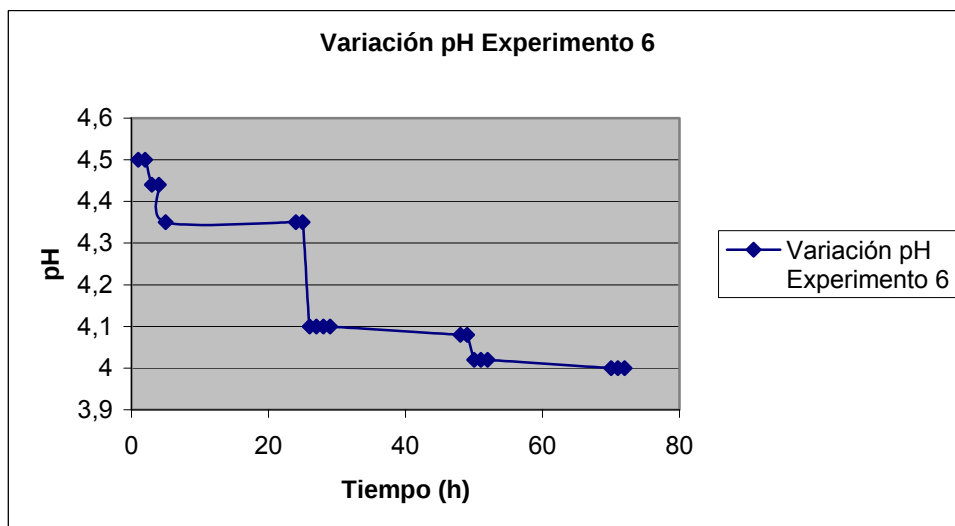
Mediciones

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

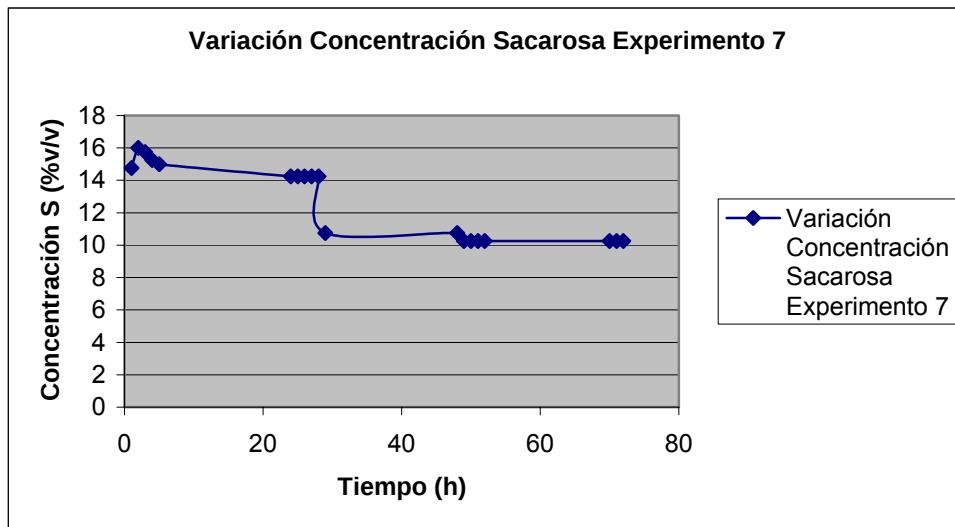
Condiciones de operación

- 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 $((\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4) = 4,2 \text{ g}$.

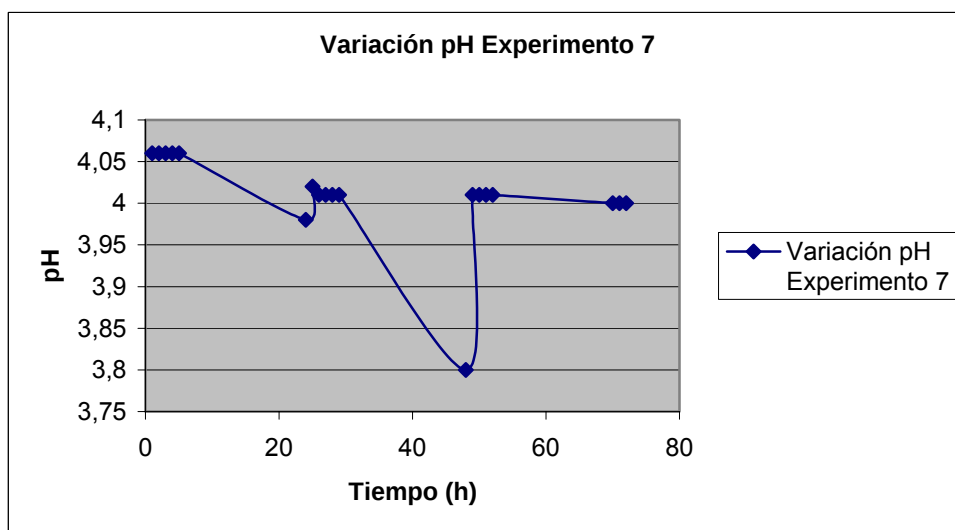
Mediciones

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:

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

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 _{Sacarosa} inicial ml	V _D ml	V _{Total Etanol} 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	Yx/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 vengan 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.

3. DISEÑO BÁSICO DE UNA PLANTA PILOTO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

3.1 Esquema del proceso de producción de etanol

El proceso de fermentación de la melaza mediante la actividad metabólica de las levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* y producción de alcohol no se basa únicamente en el tanque de fermentación, sino que comprende una serie de operaciones unitarias y de separación.

La materia prima se obtiene de la industria azucarera, un subproducto de ésta, la melaza. Ésta se ha de disolver en agua hasta llegar a una concentración de azúcares precisa. Después de la operación de disolución, se tiene la de filtración, en ella se desechan las impurezas y fangos, mediante el clarificado se obtiene el mosto que servirá como sustrato para las células.

La siguiente etapa es la de acidificación, llegando a valores bastante bajos y eliminando microorganismos sin interés industrial. El pH final debe ser el idóneo para la levadura a utilizar en el proceso.

Para terminar con este proceso de preparación del sustrato, se esteriliza, siendo la vía térmica la más usualmente utilizada. Con todo esto, se hacen alcanzar las condiciones de operación óptimas del sustrato para su posterior inoculación.

Así se tiene un tanque, llamado comúnmente, tanque madre, donde se encuentra sustrato inoculado. Las condiciones a las cuales se opera en este tanque son tales que benefician la generación y crecimiento de las levaduras. Así pues, se introducirá aire en altas cantidades pero previniendo la posible contaminación del reactor, ya que la introducción de aire hace mejorar las condiciones de vida en el medio de cultivo, haciendo posible la existencia de microorganismos diversos a los de interés metabólico.

Este reactor es de mezcla completa y su función es inocular a otros tanques de mayor volumen, donde se desarrolla la fermentación.

La siguiente etapa corresponde al proceso de fermentación, donde se propicia la producción de etanol a través de una buena alimentación proveniente del tanque madre, una temperatura de operación óptima y una buena agitación. Estos tanques son de mezcla perfecta, dotados de un sistema de agitación y aireación, además de la adecuada instrumentación para el control de las variables. También poseen una camisa para su calefacción o refrigeración según convenga. Inicialmente se encuentran llenos de sustrato fresco listo para recibir aporte de levaduras disueltas en medio de cultivo, proveniente del tanque madre.

El producto de esta fase se debe separar a través de la destilación y mediante la deshidratación se obtendrá Etanol. Los demás productos van desde los granos secos de destilería soluble (DDGS) hasta los fangos.

En el esquema, representado en el esquema 2, se puede ver cuáles son los procesos fundamentales en la producción de etanol.

3.2 Esquema de una planta piloto

Este proyecto está basado fundamentalmente en la experimentación. A escala laboratorio se ha estudiado el comportamiento del proceso de fermentación. A partir del cual se ha intentado obtener unos rangos de operación óptimos y unas condiciones de trabajo adecuadas para aumentar la productividad del producto deseado.

Este apartado trata sobre el diseño de una planta piloto, teniendo en cuenta los datos obtenidos en la fase experimental. Además de los datos de la fase experimental, a través de la búsqueda de información sobre experimentos ya realizados, se tomarán como referencia los resultados de estas investigaciones.

Se ha propuesto un esquema a seguir en el proceso de fabricación de etanol. Se puede ver en el esquema 3.

Esta planta piloto consta de los siguientes equipos:

- Depósito. En él se almacena la melaza ya preparada para ser usada como alimentación al tanque de inoculación.
- Tanque madre. Se tiene un tanque con sustrato fresco donde se le adiciona una cantidad de levadura, ésta se encarga de inocular el reactor y así abastecer a los demás tanques existentes de microorganismos suficientes para el desarrollo del proceso. Así la materia prima de levaduras requerida inicialmente es menor, ya que parte de los microorganismos los fabrica el propio proceso.
- Tanques de fermentación. En ellos transcurre el proceso de fermentación. Estos reactores contienen sustrato fresco y están alimentados por el tanque madre que les proporciona biomasa inoculándolos.
- Sistema de separación. El alcohol obtenido de la fermentación debe ser separado de los demás subproductos.
- Sistemas de agitación. Este sistema está instalado en cada reactor y así consigue mejorar las condiciones de operación, haciendo que tales tanques sean reactores de mezcla perfecta.
- Sistemas de aireación. Se suministra aire a cada tanque de fermentación y al tanque madre, los caudales difieren de un equipo a otro y también dependen del tiempo en el que se encuentre el proceso.
- Calentamiento/refrigeración. A través de una camisa o resistencia se calentarán los reactores, suministrado esta agua una manta calefactora, esto es para mantener la temperatura óptima. Si se desprende mucha energía de la reacción, esta agua se convertirá en refrigerante.
- Líneas de proceso. Se tienen varias líneas, la de alimentación, la de producción, la de dióxido de carbono, la del agua y la de fangos.
- Dispositivos de control. Tales dispositivos miden los valores de las variables de control, controlan los caudales y las condiciones de operación, como el pH y la temperatura.

Cada fermentador constará de un medidor de pH en continuo, de un termómetro y un medidor de flujo. En el esquema 4 se ve con más detalle las líneas que entran y salen del reactor, las concentraciones iniciales y finales, el modo de operar y el sistema de calefacción. En base a él se ha diseñado el reactor biológico.

Se parte de un depósito que contiene sustrato fresco preparado para ser utilizado. De este depósito salen tres corrientes, una de ellas alimenta al tanque madre, las otras dos suministran sustrato de manera continua a los dos fermentadores, una vez que haya comenzado el proceso de fermentación.

El tanque madre es alimentado de sustrato de forma discontinua. A este tanque también le llega una cierta cantidad de levadura, ésta se introduce en el caldo de cultivo y se opera de tal forma que se estimula el crecimiento de éstas. Cuando se ha llegado al crecimiento estacionario (48 horas) se inoculan los otros dos tanques.

Esta alimentación de microorganismos disueltos en el propio medio de fermentación es discontinua y sirve para inocular a los dos fermentadores.

Cuando los reactores están ya inoculados se comienza la alimentación continua de sustrato fresco. Por otro lado va saliendo una corriente con el sustrato convertido en alcohol, en más células y en sustrato no convertido. Además por arriba sale dióxido de carbono que es otro subproducto de reacción.

Se suministra aire sólo a un reactor. El tanque madre se aireará de forma continua ya que este hecho beneficia la proliferación de células. Sin embargo, los dos fermentadores no serán aireados ya que las condiciones microaerobias mejoran la producción de etanol.

El aire es bueno porque desplaza al dióxido de carbono y lo hace salir del reactor de forma más rápida, esto es beneficioso ya que evita el efecto inhibitor del dióxido de carbono. Además el aire también sirve como agitador de la mezcla. Por ello, los tanques de fermentación tendrán una apertura superior a la atmósfera para hacer más fácil la salida del dióxido de carbono.

Por otro lado, se podría pensar que esta apertura al ambiente aumentaría el riesgo de contaminación. Este riesgo se hace mínimo cuando el medio es acidificado y la concentración de alcohol es alta, ya que convierten el medio de cultivo en hostil y áspero para la supervivencia de microorganismos ajenos al proceso.

De cada fermentador sale una corriente de producto, estas dos corrientes se unen en una sola y se llevan a un separador donde se obtendrá el etanol y fangos.

El agua sale de un baño calefactor y alimenta las chaquetas de cada reactor fijando la temperatura de operación a la indicada.

3.3 Descripción de los equipos de la planta piloto

Depósito

El depósito tiene una capacidad de 1 m^3 . Es de plástico recubierto de lana de vidrio. Este aislante se usa para evitar que existan cambios muy bruscos de temperatura entre el sustrato contenido en el depósito y el caldo de cultivo de los reactores a los cuales alimenta. El depósito contiene melaza en disolución ya preparada para ser usada en el proceso. El pH de la mezcla es ácido pero no lo suficiente como para provocar corrosión y picaduras en el depósito.

La salida de flujo del depósito está en la parte inferior. Constará de un medidor de nivel de líquido para poder saber cuántos litros de sustrato contiene.

Su objetivo es meramente de almacenamiento. Se pretende que las propiedades del sustrato almacenado no varíen de forma considerable por varios días.

Un parámetro importante es la concentración del sustrato, ya que éste es alimentado a los otros reactores e interviene de manera muy importante en los resultados finales. Por ello, el material del cual está compuesto el depósito debe ser inerte, tal que no interacciona con el sustrato y no varíe su naturaleza química y física.

Tanque madre

El tanque madre es una cuba de fermentación microbiana, la cual es inoculada directamente con una masa precisa de levaduras. Es igual que los otros dos reactores solo que su volumen será menor. Este corresponde a 25 litros mientras que los otros dos serán de 50. Este reactor trabajará en discontinuo. Consta de un sistema de aireación y de agitación. A través de las válvulas se controlará el aporte de aire, el suministro de sustrato proveniente del depósito y la salida de flujo hacia los otros dos reactores.

El reactor es de acero inoxidable 316, para evitar una posible corrosión por el uso de reguladores de pH en el sistema. Todos los reactores serán del mismo material.

La función de este reactor es crear en su medio las condiciones óptimas para el desarrollo de la levadura y así aumentar el crecimiento de ésta. Una vez conseguido esto, alimentará de forma discontinua a los otros dos reactores, inoculándolos y haciendo posible el proceso de producción de alcohol.

Las condiciones óptimas de operación en este reactor se refieren a una temperatura óptima para aumentar el crecimiento de las células, una aireación intensa para evitar altas concentraciones de dióxido de carbono y dar condiciones aerobias y finalmente una buena agitación para conseguir una eficiente transferencia de materia y homogenización de la mezcla.

Este tanque será de mezcla completa, es decir que su concentración en el interior es igual a la de salida.

Las ecuaciones que lo modelan son las correspondientes al reactor de mezcla completa discontinuo. El crecimiento de las células será descrito por la ecuación de Monod.

La ecuación de balance de materia se reduce a la siguiente expresión:

$$(Acumulación) = (Generación - Por Reacción)$$

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = V \cdot r_x$$

Ya que los caudales de entrada y salida son cero.

Por otro lado la velocidad de crecimiento de las levaduras, considerando una cinética Monod se puede escribir de la siguiente forma:

$$r_x = \mu \cdot X = \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{K_s + S}$$

Y el consumo de sustrato, a través del factor de rendimiento $Y_{X/S}$.

$$r_s = -\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{K_s + S}$$

Si se supone que $Y_{X/S}$ permanece constante, se puede obtener evaluar el crecimiento celular en función del consumo de sustrato.

$$X_e + Y_{X/S} \cdot S_e = X + Y_{X/S} \cdot S$$

Finalmente se obtiene el tiempo necesario para reducir la concentración del sustrato limitante a un valor fijado por el diseñador.

$$(X_e + Y_{X/S} \cdot (S_e + K_s)) \cdot \ln\left(\frac{X_e + Y_{X/S} \cdot S}{X_e + Y_{X/S} \cdot (S_e + K_s)}\right) - K_s \cdot Y_{X/S} \cdot \ln\frac{S}{S_e} = \mu_m \cdot (X_e + Y_{X/S} \cdot S_e) \cdot t$$

Se ha aplicado la hipótesis de sustrato limitante, es decir, los microorganismos se alimentan de muchos nutrientes existentes en el medio, pero sólo uno es limitante, en este caso se ha considerado que la sacarosa es el nutriente limitante.

Para este reactor se ha de fijar varios parámetros:

- Volumen del reactor
- Masa de levadura a añadir
- Concentración inicial de sacarosa en el medio (depende de la concentración del sustrato almacenado)
- Concentración final de sacarosa, esto determina el tiempo de operación
- Material
- Los parámetros cinéticos y estequiométricos característicos del proceso, $Y_{X/S}$, K_S , μ_m
- Condiciones de operación
 - Temperatura
 - pH (volumen de ácido/base añadido)
 - Presión
 - Caudal de aire
 - Potencia de agitación

Fermentadores

Este tipo de reactor es comúnmente llamado quimiostato. Opera en continuo y el flujo de entrada y el de salida son iguales de manera que el volumen total contenido en el reactor es constante. Constan de un sistema de agitación que homogeniza la mezcla, tanto en concentración de biomasa, nutrientes y producto como en los parámetros físicos como la temperatura y el pH.

La ventaja principal de operar en continuo es la retirada de producto y el suministro de sustrato fresco al reactor. Así las condiciones en el interior son más beneficiosas y las levaduras pueden seguir metabolizando los azúcares y produciendo alcohol.

Las ecuaciones que definen a estos dos reactores son las específicas de reactores de mezcla perfecta operando en continuo. La cinética considerada es la de Monod, sabiendo que se está haciendo una aproximación. También se considerará régimen estacionario.

Cuando existe una baja concentración de sustrato limitante o la concentración de alguna sustancia tóxica aumenta de forma considerable, el crecimiento de las células pasa de ser exponencial a estacionario.

Cuando el aporte de sustrato al reactor haga que la concentración de azúcares sea constante, esto causará un estado de equilibrio, en el cual, la concentración de biomasa también será constante. Se habrá llegado al régimen estacionario.

Las ecuaciones del sistema se escriben para tal estado.

La ecuación de balance de materia ya que el término de acumulación es nulo.

$$V \cdot r_x + Q \cdot (X_e - X) = 0$$

Si se parte de que las concentraciones de etanol y levaduras son nulas en el caudal de entrada de alimentación de sustrato fresco (alimentación estéril), se pueden escribir las siguientes ecuaciones:

Para la biomasa

$$X = Y_{\frac{X}{S}} \cdot \left[S_e - \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D} \right]$$

Para el sustrato

$$S = \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D}$$

Para el producto

$$P = \frac{Y_{\frac{P}{X}} \cdot \mu \cdot X}{D}$$

Y la velocidad de dilución

$$D = \frac{Q}{V}$$

Las variables X, S y P definen el estado del proceso. Son las concentraciones de biomasa, sustrato y producto en el interior y a la salida del reactor.

D y S_e son variables que se fijan desde el exterior, μ_m , K_s , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ son parámetros cinéticos y estequiométricos característicos del proceso. Es decir, se pueden encontrar tabulados dadas unas condiciones de operación precisas.

Como se opera sin recirculación se puede dar un problema que hay que tener en cuenta. El lavado del reactor. Éste se da cuando la velocidad de dilución se iguala a la velocidad específica de crecimiento de las células ($D = \mu_m$).

Ocurriría lo siguiente:

$$D = \mu_{m\acute{a}x} \rightarrow D \cdot X \gg \mu \cdot X \text{ ya que } \mu \ll \mu_{m\acute{a}x}$$

Esto significa que el flujo de biomasa hacia el exterior es mayor que flujo aportado por el crecimiento celular. Y por tanto se produce un descenso considerable en la concentración de biomasa en el reactor, se tendría un valor infinitésimo de microorganismos. También la concentración del producto sería muy pequeña ya que la velocidad de dilución es máxima.

Operar cerca de las condiciones de lavado es beneficioso ya que la productividad se hace máxima, pero es arriesgado ya que cualquier cambio en las variables del proceso (temperatura, concentración de entrada de sustrato, caudales...) pueden llevar a la fatalidad, es decir, al lavado del reactor y hacer así la concentración de biomasa nula.

Es decir, operando en un punto próximo al crítico se consigue máxima productividad celular y de producto.

Por ello la velocidad de disolución tiene una restricción, su valor ha de ser menor que el crítico para que el reactor no entre en inestabilidad.

$$D_C = \mu_m \frac{S_e}{K_s + S_e}, \text{ para ello } D < \mu_{m\max}$$

El valor de la velocidad de disolución que maximiza la productividad, sin entrar en inestabilidad, es el siguiente:

$$D_m = \mu_m \cdot \left[1 - \left(\frac{K_s}{K_s + S_e} \right)^{0,5} \right]$$

Para caudales bajos la velocidad de dilución tiende a cero y como consecuencia la concentración de sustrato en el interior del equipo se hace muy pequeña. Por lo contrario la concentración de biomasa aumenta haciéndose máxima.

A medida que aumenta la velocidad de dilución la concentración de sustrato en el reactor va aumentando, esto se traduce en una menor conversión del sustrato.

Por eso se ha de fijar el caudal adecuado de sustrato fresco.

Se debe de tener en cuenta que si se fija la velocidad de dilución a un determinado valor, se puede llegar a las condiciones de equilibrio en el crecimiento celular. Para ello se ha de igualar el ritmo de dilución al coeficiente de crecimiento. Entonces la variación de biomasa respecto del tiempo será nula y se llegará al equilibrio.

$$\frac{dX}{dt} = x \cdot m - x \cdot D = x \cdot (m - D)$$

$$D = m \rightarrow \frac{dX}{dt} = 0 \rightarrow X = cte$$

En este equipo las variables a definir son las siguientes:

- Flujo (de entrada y salida, son iguales)
- Volumen del reactor
- Concentración de biomasa equilibrio
- Factor de dilución
- Concentración de entrada de sacarosa
- μ_m , K_s , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$
- Material
- Condiciones de operación
 - Temperatura
 - pH (volumen de ácido/base añadido)
 - Presión
 - Potencia de agitación
 - Condiciones anaerobias/aerobias

Sistema de calefacción

La planta consta de un equipo de calentamiento de agua para distribuirla por el interior de las camisas de los reactores y conseguir así fijar una temperatura óptima de operación. Este baño térmico dispone de una bomba capaz de suministrar el caudal requerido para cumplir su objetivo.

La temperatura a la que se debe llegar es de 32°C y no es necesaria mucha potencia de impulsión.

Al ser el volumen de los reactores menor a 500 litros, el sistema de calefacción mediante la chaqueta térmica es válido y suficiente.

Sistema de aireación

La demanda de oxígeno depende de la naturaleza de los microorganismos, de la fase en crecimiento en que se encuentren tales y de la naturaleza de la fuente de carbono.

El aire será suministrado sólo al tanque madre ya que los otros trabajan mejor en condiciones anaerobias.

El aire suministrado a través del compresor crea unas burbujas que se forman en el inyector, difusor o también llamado sparger. Éste suele estar situado por debajo de la zona de agitación. En este caso se tiene una línea de aire de alta calidad, si fuese necesario se le instalaría un equipo de filtrado a la entrada al tanque madre, así se reduciría la posibilidad de contaminación.

Este aire sólo es suministrado al primer tanque en donde sucede la proliferación de biomasa. Los demás operarán bajo condiciones microaerobias, ya que existe oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

Respecto al diseño de este sistema se deben tener en cuenta las siguientes condiciones:

- El tanque madre es de un volumen relativamente pequeño, la homogenización de la mezcla debe ser buena.
- La levadura se usa de forma libre, es decir, no queda inmovilizada bajo ningún método, esto hace que los problemas de transferencia de oxígeno se minimicen hasta el punto de poder despreciarlos.

Según estas condiciones, a la hora de elegir el tipo de difusor de aire, se tomará el más económico y apto, ya que para este caso no existen problemas de transferencia de masa.

Existen varios tipos de inyectores, tubulares, de anillo, en cruz, dispositivos de conducción abierta y difusores cerámicos porosos.

El tubular es el más usado para microorganismos miceliales. Son poco propensos a la obstrucción.

El difusor de tipo anillo es muy bueno porque cubre la máxima área del fermentador asegurando así una adecuada dispersión del oxígeno. La desventaja es que tiende a obstruirse. El de cruz es más económico y para asegurar una buena transferencia de oxígeno se utiliza en sistemas agitados.

Por otro lado el difusor cerámico poroso también consigue una gran dispersión y así mejora la difusión del aire.

En la figura 19 se muestran algunos tipos de difusores.

Para este equipo se ha de definir los siguientes parámetros:

- Caudal de aire (0,5 -1,5 volumen / volumen líquido x minuto)
- Tiempo total de suministro (especificar horas de inicio y final)

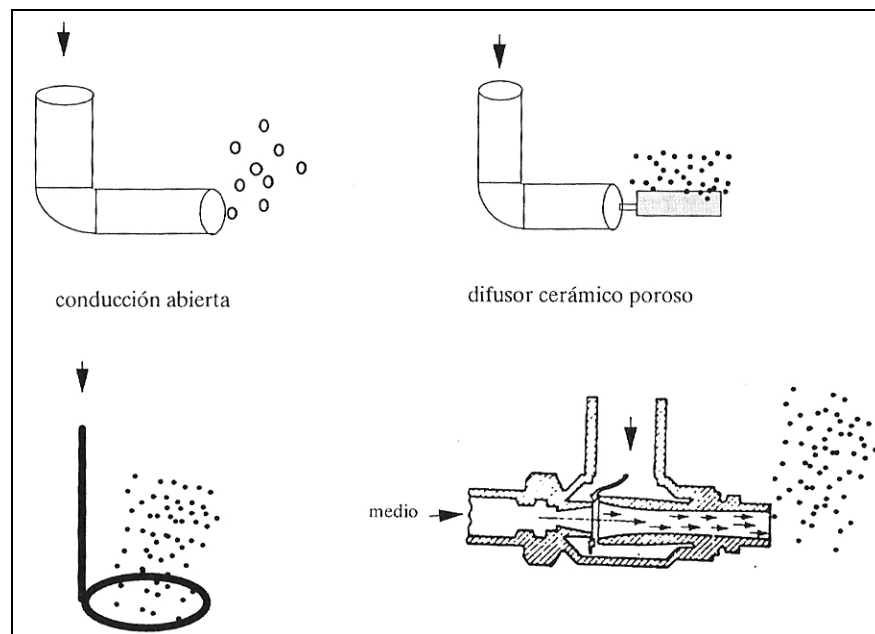


Figura 19. Tipo de difusores de aire en fermentadores.

Sistema de agitación

La planta consta de un sistema de agitación para procurar la mezcla completa en cada uno de los reactores. Además también se encarga de romper las burbujas formadas por el aire suministrado. Para el diseño de los agitadores se hace uso del número de potencia, éste varía según esté aireado el sistema o no. Esta correlacionado con el régimen del líquido en el interior del reactor. Este se define a través del número de Reynolds. Finalmente se tiene una correlación donde influye también la geometría del tanque, obteniéndose la curva de potencia, figura 20.

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

$$Re = \frac{\rho D^2 N}{\mu}$$

$$N_p = b Re^x$$

Siendo b = constante que depende de la geometría del tanque, x = exponente en función del régimen de circulación y tipo de impulsor.

Para $Re < 10$, Régimen Laminar, el N_p disminuye con el Re y la relación es:

$$N_p = \frac{b}{Re}$$

Y la potencia suministrada al fluido se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$P = b\mu N^2 D^3$$

Para $10 < Re < 1000$, zona de transición donde la curva que relaciona el N_p y el Re depende de la geometría del tanque además de las condiciones de operación.

Para $Re > 10000$, régimen es turbulento y Re no influye prácticamente nada sobre el N_p . Las curvas se hacen planas en ese tramo y la potencia absorbida se calcula de la siguiente forma:

$$P = b\rho N^2 D^5$$

La introducción de aire a un reactor agitado hace disminuir las necesidades de la potencia suministrada. La agitación en sistemas aireados se sirve de un parámetro llamado “hold-up” o retención (ϵ_g) de la fase gas.

$$\epsilon_g = \frac{V_g}{V_g + V_l}$$

$$\rho_g = \rho(1 - \epsilon_g)$$

$$N_p = \frac{P_g}{\rho N^3 D^5}$$

$$\frac{P_g}{P} = \frac{\rho_g}{\rho} = (1 - \epsilon_g)$$

Mediante esta ecuación se calcula la disminución de potencia debida a la aeración.

Esta disminución se ve afectada por todas las variables que alteren el valor de ϵ_g , como puede ser la velocidad de agitación, el tamaño de burbuja, el tipo de agitador, la tensión superficial, la viscosidad,...

Para estimar las necesidades de potencia en un sistema aireado se hace uso de un módulo adimensional llamado módulo de aireación (N_a).

Este módulo se define como el cociente entre la velocidad superficial del gas y la velocidad tangencial en el extremo del impulsor.

El valor de N_a indica el grado de dispersión de las burbujas alrededor del impulsor.

$$N_a = \frac{Q_g}{D^2 ND} = \frac{Q_g}{ND^3}$$

La relación entre el número de potencia y el módulo de aireación se obtiene mediante la existencia de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador.

Los tipos de impulsores que existen son varios, los de turbina de disco (Rushton), la turbina de palas planas, la hélice, de disco combinado y de turbina abierta con paso variable.

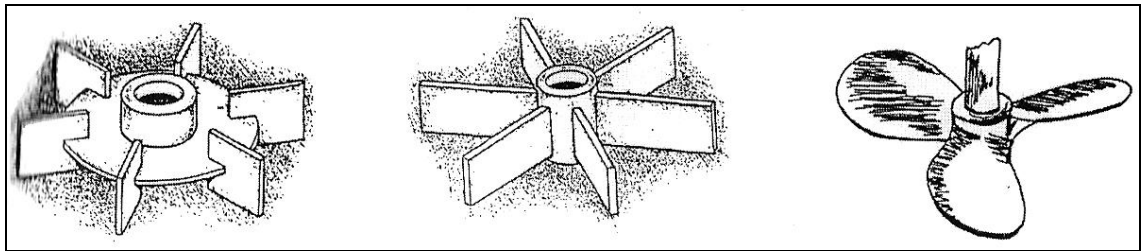


Fig. 20 Esquema de diferentes tipos de impulsores de agitación

La turbina de disco o Rushton con seis o cuatro hojas requiere mucha potencia aunque es sencilla y fácilmente intercambiable. El ángulo de la paleta puede variar.

La de tipo hélice es la más usada para el cultivo de células vegetales y animales ya que no crea un efecto alto de cizalla.

El agitador más efectivo es uno de turbina con deflectores. Combinando así las ventajas de uno y otro.

La potencia necesaria para mover los rodets en los recipientes agitados utiliza la corriente eléctrica. Para una determinada velocidad de agitación la potencia necesaria depende de la resistencia ofrecida por el fluido a la rotación del rodete.

El consumo medio de potencia a escala industrial va desde los 1Kw para tanques de 0,1 m³ hasta 200 Kw.

Para un volumen de unos 50 litros se puede aplicar una potencia alrededor de los 80 Kw.

El rozamiento producido en la caja de cambios del motor del agitador y las juntas reducen la energía transmitida por lo que la energía consumida por el motor del agitador será siempre mayor que la necesaria para la mezcla.

Para el diseño de este sistema, que se usarían dos tipos ya que el tanque madre y los otros dos reactores tienen características diferentes, se han de fijar las siguientes variables.

- Geometría del tanque
- Tipo de agitador
- Existencia de deflectores
- Densidad del medio de cultivo
- Viscosidad del medio de cultivo
- Caudal de aireación (volúmenes de aire/volumen del fermentador y minuto) Si existiese tal suministro
- Velocidad de agitación

Con estas especificaciones y a través de la curva de potencia y de las proporciones estándar de los fermentadores, se puede obtener la potencia a suministrar del sistema.

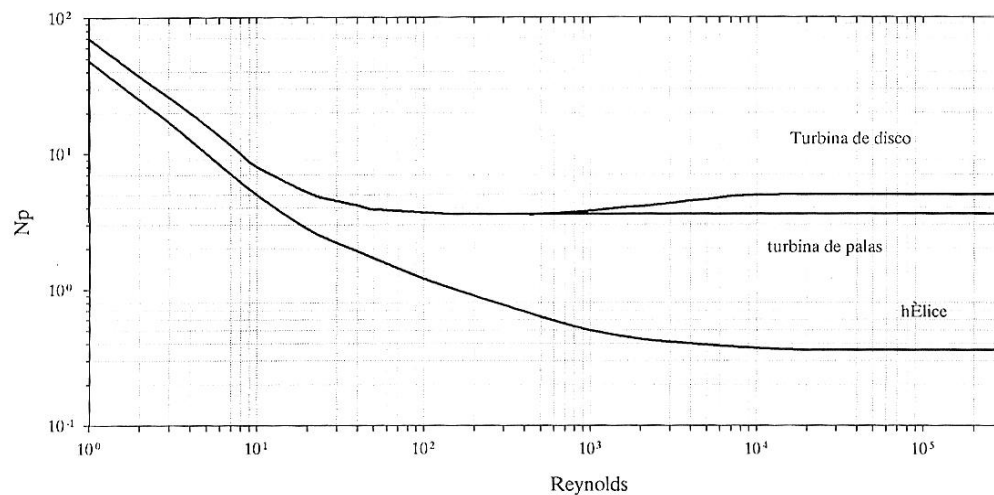


Fig. 21 Relación entre el número de potencia y el de Reynolds para diferentes tipos de impulsores.

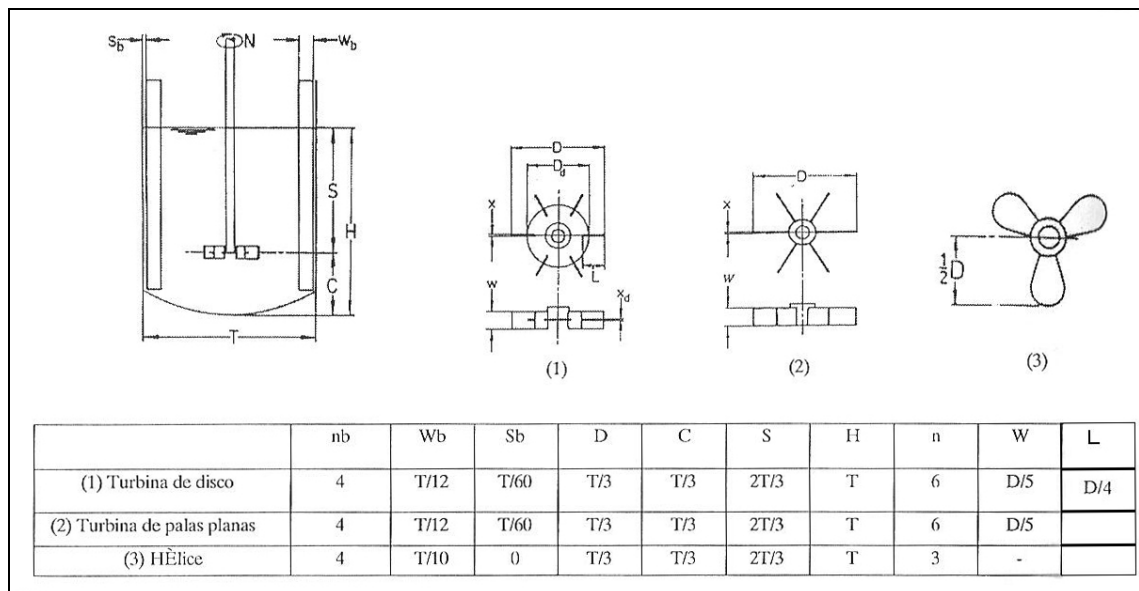


Fig. 22 Esquema de las proporciones y relaciones geométricas estándar para fermentadores

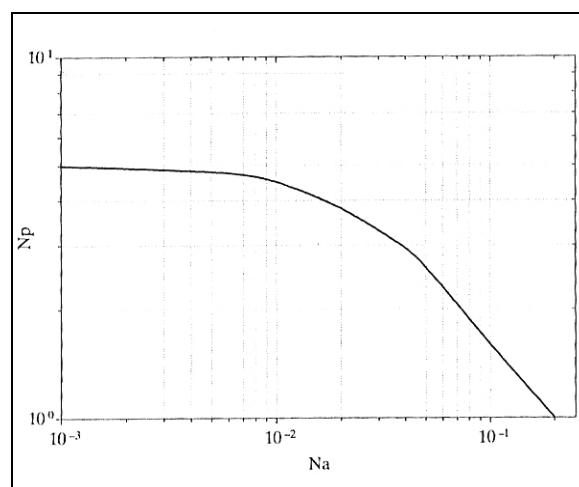


Fig. 23 Sistemas aireados. Relación entre el número de potencia y el número de aeración para turbinas de disco.

3.4 Elección de parámetros para el diseño

Sustrato

La concentración de sacarosa en la disolución final de sustrato ha de ser del 16,5% v/v. Esto quiere decir que se tiene una concentración de 134 g/l. Lo que indica que se necesitan 115 kg de melaza para disolverlas en un volumen de agua de 1600 litros.

La cantidad de fosfato diamónico a añadir depende de la masa de melaza existente. Si por cada 1000 kg de melaza se adicionan 500 gramos de fosfato, entonces la cantidad total a añadir será de 57,5 gramos.

La disolución tiene inicialmente un pH básico y éste se ha de acidificar hasta un valor de 4,5. Para ello se ha de añadir una cierta cantidad de ácido clorhídrico no muy diluido para no diluir aún más la melaza.

A escala laboratorio, con un reactor de capacidad 1 litro, eran necesarios 20 ml de ácido clorhídrico 0,5 molar. Para un volumen de 1600 litros serán necesarios unos 32 litros de ácido. Para disminuir la cantidad de ácido a añadir se puede doblar su concentración, 1M y así se consigue que la melaza quede menos diluida, a parte de ocupar un menor volumen. Así que se adiciona 16 litros de ácido clorhídrico 1M.

La mezcla se ha de agitar muy bien. Está seguirá todos las etapas de preparación ya indicadas en capítulos anteriores hasta obtener un mosto listo para alimentar a los reactores.

Entonces, de forma esquemática, las condiciones que ha de cumplir el sustrato son:

- 115 kg de melaza
- 16,5 % v/v de sacarosa (nutriente limitante)
- pH = 4,5
- Adición de fosforo y nitrógeno a través del fosfato diamónico, 58 gramos

Depósito

En la elección del volumen del depósito se ha de tener en cuenta el caudal de alimentación continuo hacia los fermentadores.

Si se quiere suministrar un caudal de 10 l/h durante un tiempo de 72 horas, que es la duración de la operación en continuo, se tiene un total de 720 l. Y como son dos reactores, el volumen asciende a 1440. Por otro lado se ha de contar con el llenado de todos los reactores, adición de ácido, esto haría un total a groso modo de 1500 litros.

- $V = 2 \text{ m}^3$ (volumen líquido = 1600)
- Plástico

Tanque madre

- $V = 25 \text{ l}$
- $m_L = 10$ gramos (Saccharomyces Cerevisiae, IFI 255, microaerobia)
- $S_0 = 16,5\%v/v$
- $S_f = 11\%v/v$
- Tanque de acero inoxidable 316

- $Y_{X/S} = 1,2 \text{ g células/ g sustrato}$
- $K_S = 5 \text{ g/l}$
- $\mu_m = 0,24 \text{ h}^{-1}$
- Condiciones de operación
 - $T = 32 \text{ }^\circ\text{C}$
 - $\text{pH} = 4,5$
 - $P = 1 \text{ atm}$
 - $Q_{\text{aire}} = 0,8 \text{ vvm}$
 - $P_{\text{agitación}} = 1,43 \text{ kw}$ (ver en sistema de agitación)

A través de la elección de los parámetros se obtiene un tiempo de proceso de 18 horas. En este tiempo se forma 54,55 g/l de biomasa.

Resultados finales

- Duración de la inoculación = 18 horas
- Velocidad de crecimiento = 3,03 g/lh
- Concentración final de biomasa = 54,55 g/l

Fermentadores

Son dos tanques de mezcla perfecta dispuestos es paralelo. Se pueden considerar independientes. Tienen las mismas características y por ello sólo se diseñará uno de los dos.

- $D = 0,19 \text{ h}^{-1}$ (máxima productividad)
- $V = 50 \text{ l}$
- $Q_e = Q_s = 10 \text{ l/h}$
- $X_{eq} = 54,55 \text{ g/l}$
- $S_0 = 16,5\% \text{ v/v}$
- $Y_{X/S} = 0,8 \text{ g células/ g sustrato}$
- $K_S = 5 \text{ g/l}$
- $\mu_m = 0,24 \text{ h}^{-1}$
- $Y_{P/S} = 1,6 \text{ g alcohol/g sustrato}$
- Acero inoxidable
- Condiciones de operación
 - $T = 32^\circ\text{C}$
 - $\text{pH} = 4,5$
 - Presión = 1 atm
 - $P_{\text{agitación}} = 3,98 \text{ kw}$ (ver sistema de agitación)
 - Condiciones anaerobias

Con esto se tiene que las concentraciones de biomasa, sustrato y producto en el interior y en la corriente de salida del reactor son las siguientes:

- $X = 92 \text{ g/l}$
- $S = 19 \text{ g/l}$
- $P = 147,2 \text{ g/l}$

Sistema de agitación

Se tiene dos tipos de sistemas de agitación ya que se tiene un tanque de mezcla perfecta de 10 litros sometido a aireación y otros dos de 25 litros sin suministro de aire.

Para hallar la potencia a suministrar en los dos se van a escoger las siguientes variables:

- $V_{\text{tanqueM}} = 25 \text{ l} \rightarrow D_{\text{tanqueM}} = 0,30 \text{ m}$, $H_{\text{tanqueM}} = 0,36 \text{ m}$ (para el tanque madre)
- $V_{\text{Fermentador}} = 50 \text{ l} \rightarrow D_{\text{fermentador}} = 0,30 \text{ m}$, $H_{\text{fermentador}} = 0,71 \text{ m}$ (para los dos fermentadores)
- $\rho_{\text{cultivo}} = 1100 \text{ kg/m}^3$
- $\mu_{\text{cultivo}} = 0,01 \text{ kg/ms}$
- $Q_{\text{aire}} = 0,8 \text{ vvm}$ (para el tanque madre)
- $V_{\text{agitación}} = 250 \text{ rpm}$
- Tipo de impulsor: Turbina de disco

Cálculo de la potencia a suministrar sin aireación

De la figura 22 se establece el diámetro del impulsor.

$$D = \frac{T}{3} = \frac{0,30}{3} = 0,1 \text{ m}$$

$$Re = \frac{N \cdot D^2 \cdot \rho}{\mu} = \frac{\frac{250}{60} \cdot 0,1 \cdot 1100}{0,01} = 45833,33 \approx 4 \cdot 10^4 \text{ (Régimen turbulento)}$$

De la figura se calcula el número de potencia: $N_p = 5$

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 D^5 = 5 \cdot 1100 \cdot \left(\frac{250}{60}\right)^3 \left(\frac{0,3}{3}\right)^5 = 3,98 \text{ KW}$$

Cálculo de la potencia a suministrar con aireación

$$N_a = \frac{Q_g}{ND^3} = 0,0799 \approx 0,08$$

$$Q_g = 0,8 \frac{\text{m}^3 \text{ gas}}{\text{m}^3 \text{ fermentador} \cdot \text{min}} V_F = 0,8 \cdot 0,025 \cdot \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ s}} = 3,33 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 / \text{s}$$

A través de la figura 5 y utilizando el número de aireación se puede calcular el número de potencia y a partir de ahí, obtener la potencia a suministrar al gas.

$N_p = 1,8$

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 D^5 = 1,8 \cdot 1100 \cdot \left(\frac{250}{60}\right)^3 \left(\frac{0,3}{3}\right)^5 = 1,43 \text{ KW}$$

Antiespumantes

La mejor manera de evitar la formación de espumas es mediante dispositivos mecánicos, como los discos rotatorios de alta velocidad. Para tanques de fermentación más voluminosos, estos discos carecen de la potencia necesaria para romper tales burbujas. Por ello se utiliza unas sustancias químicas llamadas antiespumantes.

Estos aditivos tienen beneficios y desventajas. Por un lado hacen bajar la tensión superficial y con ello disminuyen la tendencia a coalescer de las burbujas. Esto es beneficioso ya que así aumenta el área interfacial de las burbujas al ser su diámetro menor y su cantidad mayor. Pero por otro lado, la adición de antiespumantes reduce la movilidad de la interfase actuando directamente sobre el coeficiente de transferencia de masa, haciendo su valor menor.

Por todo esto, hay que discutir si netamente es bueno o no añadir antiespumantes, comparando los pros y los contra. La formación de excesivas burbujas también hace disminuir la difusión del oxígeno.

Productividad

La planta inicia su arranque llenando el primer reactor, tanque madre. Cuando se han alcanzado las condiciones ideales de crecimiento, se suministra la masa de levadura especificada anteriormente. Al cabo de 18 horas se tiene un cultivo en fase exponencial ya que hasta que no se llegue a las 48 horas no se tiene la fase estacionaria.

El interés es inocular a los demás reactores en fase exponencial y que una vez dentro alcancen la fase estacionaria.

La planta, para la primera vez que se arranque estará 18 horas más 72 horas del proceso en continuo en funcionamiento, es decir, 90 horas. Pero en la próxima operación, el periodo de crecimiento será más rápido porque el tanque madre ya estará inoculado de la anterior vez.

La concentración de producto en la corriente de salida es de 147,2 g/l.

$$Productividad = t_f \cdot P \cdot Q \cdot N_R = 147 \cdot 72 \cdot 10 \cdot 2 = 211,68 kg$$

Donde t_f es el tiempo total de proceso, P es la concentración de producto a la salida, Q es el caudal de salida, y N_R es el número de reactores que operan.

Esta cantidad de alcohol se debe separar por destilación de la corriente final del proceso.

$$Y_{P/X} = \frac{211,8 kg alcohol}{115 kg Melaza} = 1,8$$



Fig. 24 Algunos tanques de fermentación

4. CONCLUSIONES

4.1 Introducción

Las conclusiones obtenidas en este estudio son muy variadas. Por un lado, la parte más importante, la fase experimental. Con ella se ha llegado a definir las variables más apropiadas para el desarrollo del proceso. También se ha obtenido una metodología de trabajo, respecto a la preparación de sustrato, mantenimiento celular, modo de operar en el reactor...

Han existido dificultades en lo que respecta al seguimiento continuo de las variables del proceso, y por ello no se ha podido completar la investigación. Así se han hecho suposiciones para los cálculos en el diseño de la planta.

Por otro lado está la parte teórica, de diseño de una planta de producción de etanol. Ésta se basa en la experimental. Con ella se aplican las ecuaciones por las que se rige la fermentación.

Con la parte de combustibles alternativos y un breve repaso a la situación del mundo actual, se llega a tener conciencia de la necesidad de un cambio en el modo de vida occidental. Donde la vida útil de los artilugios es mucho menor que la vida de estos mismos como residuos.

Además, el consumo de los combustibles fósiles está llegando a su fin y se debe dejar paso a otra era, a la de los biocarburantes.

En este proyecto los rendimientos no han sido muy grandes pero se ha demostrado que se puede obtener etanol a través de la melaza, que no es más que un subproducto de la remolacha, de manera sencilla y no muy costosa.

Si se mejoran las condiciones de operación, respecto a las técnicas de esterilización, separación del producto final e instrumentos de medida, se puede obtener un mayor rendimiento a escala laboratorio. A través de esta fase se puede desarrollar un modelo basado en las ecuaciones del proceso. Con este modelo se puede obtener el diseño óptimo y así concluir en la construcción de una planta piloto de producción de etanol.

4.2 Conclusiones

1. La alta concentración de alcohol en el cultivo hace detener la actividad de las células, a la vez que constituye una barrera a la posible contaminación del proceso por microorganismos extraños.
2. La acidificación restringe el tipo de microorganismos a habitar en el caldo de cultivo, haciendo este rango mínimo y mejorando así la productividad.
3. Se evita la contaminación por todos los medios para que la mayor parte de los nutrientes sean transformados en etanol, más células de interés y en el mantenimiento de las actividades vitales de los microorganismos.
4. La aireación es importante para desplazar más rápido el dióxido de carbono del reactor, ya que éste es tóxico e inhibe la actividad de las células. Por otro lado hace aumentar el pH de la mezcla y con ello abre el abanico a muchas bacterias, reduciendo así la eficiencia de la conversión de los nutrientes.

Por ello el aire se suministra pasado un tiempo de proceso tal que el pH sea lo suficiente bajo como para que un pequeño aumento no haga posible la contaminación del medio.

5. Para este estudio se ha considerado la hipótesis de nutriente limitante, es decir, los demás nutrientes están en exceso y sólo la sacarosa está en defecto. Es decir, todo depende de ella.
6. La operación en discontinuo a escala laboratorio se utiliza para obtener los coeficientes estequiométricos y cinéticos.
7. La operación en continuo es más eficiente ya que va llegando sustrato fresco con el caudal de entrada y se va retirando sustrato agotado.
8. La operación en continuo con recirculación hace posible la operación con velocidades de dilución mayores, ya que evita el riesgo de lavado del reactor.
9. En toda planta existe un tanque inicial de menor volumen donde se inocula directamente con levadura, ya sea seca o en fase latente. Éste alimenta a los demás, después de un tiempo, inoculándolos y así rentabilizando el consumo de levadura como materia prima. Ya que una gran mayoría de la levadura utilizada será generada en la propia línea del proceso.
10. Las condiciones microaerobias son ideales para la producción de etanol.
11. Cuando se opera con células libres, la concentración celular en la corriente de recirculación es pequeña y se debe instalar un separador antes de proceder a la recirculación.
12. El operar con células inmovilizadas aumenta la eficiencia aunque también se ven alzados los costes de inversión.

5. Futuras líneas de investigación

En este proyecto se ha diseñado una planta piloto que trabaja con tanques de mezcla completa y en continuo. Uno de los avances a introducir de forma casi inmediata sería trabajar con recirculación y con células inmovilizadas. Así la concentración celular sería mayor en la corriente de recirculación.

Otra solución para aumentar la concentración celular en la corriente de recirculación utilizando células libres, sería instalar un separador, ya sea por centrifugación o por decantación por gravedad, y así aumentar la concentración de tales microorganismos.

El uso de células inmovilizadas puede aumentar de forma considerable el rendimiento de la operación ya que en la corriente de salida disminuiría la cantidad de células arrastradas hacia el exterior.

Por otro lado, un cambio en la tecnología del reactor sería una medida bastante buena para aumentar la eficiencia del proceso. Para ello se debería hacer un análisis de costes y estudiar así su rentabilidad.

Con los medios suficientes para realizar un seguimiento continuo de las variables fundamentales como la concentración de los azúcares reductores, la biomasa, el etanol, el pH y la temperatura, se podría obtener un modelo que describa el proceso.

Con este sistema de ecuaciones que rigen el funcionamiento del proceso, se puede hacer un diseño óptimo a través de programas de simulación como el Aspen plus, Matlab u otros.

Con este diseño se puede construir una planta piloto con base experimental y teórica, ahorrando tiempo y número de experimentos.

Otra medida a aplicar es la de un control automático que regule la temperatura, los caudales y el pH.

ANEXO 1

COMBUSTIBLES ALTERNATIVOS

1.1 Introducción

Durante la última década el consumo del petróleo se ha mantenido prácticamente sin cambios, debido esencialmente a que la reducción progresiva del petróleo como fuente de energía para usos ajenos al transporte se ha visto compensada por el fuerte crecimiento del consumo para este fin.

En los próximos veinte o treinta años se espera que la producción comunitaria de petróleo disminuya pero sin disminuir su demanda.

Además de esta perspectiva de evolución hay que tener en cuenta la necesidad de reducir las emisiones globales de gases de efecto invernadero, y asumir los compromisos del tratado de Kyoto. Para ello los países industrializados deberán iniciar sus programas de reducción de la emisión de dióxido de carbono durante la próxima década.

Con todo esto se ha abierto una estrategia europea de seguridad y abastecimiento de energía, donde el objetivo primordial es la sustitución de estos combustibles fósiles por otros alternativos en el uso de transportes. Esto provocaría una disminución de los gases de efecto invernadero como el decremento de las importaciones de petróleo.

Cumpliendo tal objetivo también se reduciría la contaminación por plomo y azufre, elementos que forman parte de los combustibles actuales, y la mejora significativa de la eficiencia energética actual.

Hay que tener en cuenta que cuando se usa el petróleo como combustible para el transporte no se está valorizando, ya que el rendimiento que se obtiene es muy bajo.

Cualquier cambio radical que afecte al suministro de combustible o a la tecnología de los motores utilizados en el transporte por carretera se enfrenta a una serie de dificultades.

El grueso de la población se ha habituado a tener a su disposición un automóvil cuyo coste se ha abaratado enormemente con el paso del tiempo, como también lo ha hecho el del carburante, si se compara con la renta disponible.

En la actualidad sólo es necesario repostar cada 400-600 km, el combustible puede encontrarse en todas partes y la operación de repostar se realiza en pocos minutos.

El automóvil puede servir tanto para llevar a una sola persona en un recorrido de pocos kilómetros, como para llevar a toda una familia a la otra punta del continente.

Con esto se quiere decir que el uso del automóvil no está limitado ni optimizado.

Cada día laboral las personas toman un coche de forma individual y se trasladan a su trabajo, esto origina un atasco y hace insostenible el uso de las autopistas y carreteras, produciendo así una gran contaminación y un mal humor generalizado consecuencias de las largas esperas provocadas por el explosivo crecimiento del uso del automóvil.

Además, no hay prácticamente ninguna restricción de seguridad que impida estacionar un automóvil, a pesar de que en su interior transporta una cantidad considerable de líquido altamente inflamable.

Pocas personas estarían dispuestas a enunciar cualquiera de las ventajas que ofrece un automóvil hoy día.

El transporte de mercancías no está incluido en el anterior análisis, ya que éste procura bienes y servicio. Al igual que el transporte de pasajeros.

El potencial de penetración de cualquier combustible alternativo para el futuro debe evaluarse en función de estos criterios. Cada opción requerirá tipos y niveles diferentes de inversiones en equipos e infraestructuras.

La sustitución de un porcentaje mínimo del gasóleo por biodiesel o etanol es la más sencilla, en la medida en que la creación de instalaciones de producción de dichos combustibles alternativos representa la única inversión a largo plazo.

Las pilas de combustible de hidrógeno son la opción más complicada ya que exigen una tecnología alternativa para los motores así como importantes inversiones en instalaciones de producción de hidrógeno y un sistema de distribución completamente nuevo.

La comodidad y el rendimiento de los automóviles, la seguridad del abastecimiento de combustible y el mantenimiento de un nivel bajo de impacto medioambiental y un elevado nivel de seguridad a un coste global reducido son requisitos que nunca será posible satisfacer por completo de manera simultánea.

La penetración de cualquier tecnología nueva en el sector del transporte depende del elevado nivel de disponibilidad del combustible de que se trate.

Los combustibles alternativos que se podrían desarrollar hasta alcanzar un nivel igual o superior al 5% del mercado total de combustibles de automoción de aquí al año 2020 son los siguientes:

- Biocarburantes
- Gas natural
- Hidrógeno

También se debe tener en cuenta la tecnología de los vehículos híbridos en los que se combinan la combustión interna y la energía eléctrica. Esto permite unos niveles de ahorro de combustible similares a los que pueden ofrecer los combustibles alternativos.

1.2 Eficiencia energética de los vehículos a motor

Mejorando la eficiencia energética se consigue un ahorro de combustible y una reducción de los gases de efecto invernadero.

Se intenta reducir el consumo de combustible un 35% emitiendo así 120 g/km de CO₂. Esto significaría un consumo de 5,8 litros por cada 100 kilómetros recorridos en el caso de tratarse de gasolina y de 5,3 litros por cada 100 kilómetros en el caso del gasóleo.

Para ello se deberán realizar cambios tecnológicos y las correspondientes evoluciones del mercado.

1.3 Biocarburantes

Desde que se produjo la primera crisis del petróleo en 1973 se ha considerado la biomasa como una fuente de energía alternativa al combustible fósil, cuyo uso se ha fomentado en algunos casos.

Existen algunos materiales biológicos que pueden usarse como combustible para el transporte por carreteras son los siguientes:

- Los aceites vegetales (colza, soja, girasol...) pueden transformarse en un sustituto del gasóleo denominado biodiesel que pueden mezclarse con el gasóleo convencional o utilizarse en estado puro.
- La remolacha azucarera, los cereales y otros cultivos producen por fermentación un alcohol, bioetanol, que además de poder ser adicionados directamente a la gasolina o ser utilizados como combustible de automoción en estado puro, también puede incorporarse a la gasolina tras haber sido transformado en ETBE mediante su síntesis con el isobutileno (subproducto de la destilación del petróleo). Por otra parte existen suficientes indicios que permiten pensar que el futuro se podrá producir bioetanol de una forma económicamente competitiva a partir de la madera o de la paja.
- Los residuos orgánicos pueden ser transformados en energía utilizable como combustible de automoción. Los aceites usados (aceites de fritura) se pueden convertir en biodiesel, mientras que el estiércol y los residuos orgánicos de origen doméstico permiten producir biogás. Los residuos vegetales suelen ser transformables en bioetanol. Se ha de tener en cuenta que existen muchas limitaciones respecto al rendimiento global de tales procesos pero también hay que considerar que tales materias primas son gratuitas, y no solo esto, sino que su uso evita su acumulación y da solución a la gestión de tales residuos.
- En un futuro se piensa que a través del tratamiento termoquímico de la biomasa se podrían conseguir otros carburantes líquidos como el biodimetiléter, el biometanol, los bioaceites y el hidrógeno.

En principio, los biocarburantes proporcionan una alternativa ideal ya que su contenido de carbono procede de la atmósfera, por ello resultan neutros desde el punto de vista de emisión de dióxido de carbono.

Por otro lado tienen la gran desventaja de que son costosos y requieren un consumo de energía directo para el cultivo de las cosechas y la producción de los combustibles. Este inconveniente se puede reducir si se usan los propios residuos de los cultivos como combustible de los procesos, es decir, como energía.

1.4 Gas natural

El gas natural está compuesto fundamentalmente de metano y se puede usar como combustible en un motor convencional de gasolina. Sin embargo requiere un equipo especial de almacenamiento e inyección. Por ello para su uso a gran escala sería aconsejable utilizar automóviles especialmente fabricados que el acondicionamiento de los vehículos de gasolina ya existentes.

Para permitir que los medios de transporte lleven el combustible necesario para gozar de una autonomía suficiente (más de 400 kilómetros), la conservación del gas debería hacerse a altas presiones (200 bar) o en forma licuada a $-162\text{ }^{\circ}\text{C}$. Desde el punto de vista técnico el uso de altas presiones es el más recomendable.

En Italia esta tecnología está totalmente desarrollada y comprobada. Existe una red de puntos que aprovisionan este tipo de combustible.

Por un lado se podría pensar que el metano es un combustible alternativo ideal, ya que es barato, de alto octanaje y emite menos cantidad de gases de efecto invernadero. Además permite generar una cantidad de energía equivalente a la gasolina con una reducción de las emisiones de dióxido de carbono del 20 al 25%.

Se ha de tener en cuenta que no ofrece ventajas considerables sobre el rendimiento de los motores de gasóleo más desarrollados tecnológicamente.

El uso del gas natural en los autobuses hace posible una reducción del ruido que resulta sumamente interesante en las áreas urbanas.

Respecto al objetivo marcado de conseguir mayor seguridad y abastecimiento del combustible del futuro, la mayor parte del metano sería importado del exterior de Europa, así que desde este punto de vista no ofrece ninguna ventaja respecto a la gasolina. Aunque sí se podría pensar que con el aumento de la demanda del gas natural haría que todo el mercado no dependiese sólo del petróleo. La distribución del gas natural a escala mundial es más uniforme que la de los recursos petrolíferos, su explotación y distribución es más dificultosa.

El metano es un gas que produce un importante efecto invernadero. La ventaja teórica sobre la gasolina desde el punto de vista de las emisiones de dióxido de carbono se desvanecería sólo si se produjese alguna pérdida mínima durante su distribución y almacenamiento o incluso al repostar combustible.

En la práctica se ha comprobado que la ventaja real en cuanto a las emisiones de anhídrido carbónico va desde un 15 a un 20%.

Si se ampliara el uso del metano a gran escala se debería contemplar tales pérdidas y minimizarlas. Además si se sustituyese el gasóleo por gas natural tales ventajas serían aún menores porque el rendimiento de los motores diesel es más elevado.

La energía utilizada para comprimir el gas natural a 200 bar representa una pérdida adicional del 4% de energía.

El transporte de gas natural requiere unas medidas de seguridad adecuadas. El hecho de que el metano sea más ligero que el aire y se caracterice por su reducido intervalo de inflamabilidad y elevada temperatura de ignición espontánea lo hace menos peligroso que la gasolina y el GLP. Esto indica que el uso de gas natural como combustibles no limitaría el acceso a todos los lugares, actualmente permitidos, a los automóviles que lo utilizaran.

Los costes de tales infraestructuras para el suministro de este combustible alternativo serían moderados.

1.5 Hidrógeno

Durante los últimos años, el uso de hidrógeno como combustible potencial para vehículos de motor ha sido objeto de un esfuerzo intensivo de investigación. Las pilas de combustible de hidrógeno dan como único producto de combustión el agua. Así que la emisión de gases de efecto invernadero es nula.

Usar el hidrógeno como combustible de automoción no se limita a las pilas de combustibles sino que tal gas es un combustible perfecto para los motores de gasolina convencionales. De hecho al ser el coste de los motores de combustión mucho menor que el de las pilas de combustión se prefiere utilizar el gas como combustible, por lo menos, hasta que se reduzcan tales costes de manera significativa y se mejore el rendimiento de conversión de las pilas.

El inconveniente principal de usar hidrógeno como combustible para los coches es la generación de gases de NO_x . Aunque su descomposición es casi total y no debería plantear problemas, ya que es el único contaminante producido.

Es preciso recalcar que el hidrógeno no es una fuente de energía sino un portador de ella. Suele decirse que el hidrógeno se puede sacar del agua pero esto no es así desde un punto de vista estrictamente químico. Cualquier procedimiento de generación de hidrógeno requiere el uso de fuentes de energía, como ocurre con el otro portador de energía, la electricidad. Como en el caso de la electricidad, las ventajas que puedan derivarse del uso del hidrógeno como combustible, desde el punto de vista de seguridad del abastecimiento y de las emisiones de gases de efecto invernadero, dependen de la fuente de energía que se tome para generarlo.

Si se usa una fuente de energía fósil como el carbón, la seguridad del abastecimiento se incrementa pero se generan mayores cantidades de dióxido de carbono, además del azufre.

Si la producción de hidrógeno se hace empleando alguna fuente de energía renovable o nuclear se incrementa la seguridad del abastecimiento y además se reducen las emisiones de dióxido de carbono, pero hay que tener en cuenta que este proceso tendrá sentido si esta energía es adicional a los recursos necesarios para la generación de electricidad.

El uso de hidrógeno con futuro portador de energía a gran escala presenta la ventaja de permitir la generación a partir de cualquier fuente imaginable de energía, a la que se añade la característica, que no comparte la electricidad, de almacenaje de largos periodos de tiempo.

De todas formas hay que tener presente que el hidrógeno tendría que competir con la generación de electricidad a partir de fuentes alternativas de bajo consumo de carbono, como el metano, o usando la energía nuclear, sin emisión de dióxido de carbono.

Esto indica que sólo sería ventajoso su uso si su producción se basa en recursos energéticos adicionales sin carbono o en un suministro adicional de gas natural. Este último caso se debería estudiar si es más conveniente utilizar el metano como combustible de forma directa o de forma indirecta a través de la conversión de hidrógeno para un uso posterior como pila de combustible.

La producción de hidrógeno a gran escala por electrólisis utilizando la energía del gas natural o de la electricidad constituye un proceso industrial completamente desarrollado y con poco margen para las innovaciones tecnológicas con las consecuentes reducciones económicas.

La ventaja fundamental que presenta el hidrógeno como portador de energía es que ofrece una gran capacidad de almacenamiento temporal con un mercado energético descentralizado basado en combustibles no fósiles.

La distribución del hidrógeno se basa en canalizaciones ya estudiadas y comprobadas, su comercialización a través de una red global depende de la existencia de una demanda suficientemente numerosa. Hasta ese momento la distribución mediante contenedores es más viable que la de las estaciones de servicio.

Uno de los grandes inconvenientes que se ha encontrado es el almacenamiento de una cantidad suficiente de combustible en los vehículos, ya que a volúmenes iguales de hidrógeno y metano, el primero sólo posee un 30% del contenido energético del segundo. Por ello los depósitos para el hidrógeno serían demasiados grandes y pesados si se quiere almacenar una cantidad suficiente de éste en los medios de transporte.

Se están estudiando diversas técnicas para su almacenaje en los automóviles pero ninguna de ella es comparable a la de los depósitos de alta presión, 350 bar.

Esta alternativa sería la mejor de todas, sería ideal pero sólo si se llega a un nivel alto de tecnología que haga abaratar de una forma muy considerable los costes de producción y distribución del hidrógeno, además de nuevas innovaciones en lo que respecta almacenamiento del combustible y de las pilas.

1.6 Otros combustibles y tecnologías

Automóviles eléctricos

Los automóviles eléctricos se vienen comercializando desde hace varios años pero no han conseguido suscitar gran interés en los consumidores.

La relación entre el tamaño y coste de las baterías y la energía que contienen no permite fabricar un automóvil de tamaño, potencia y autonomía a un precio competitivo. Además tiene la gran desventaja de la lenta recarga de las baterías.

En estos últimos años parece haberse perdido la esperanza de encontrar nuevas tecnologías que hagan a tales coches más eficientes.

El uso más correcto para tales vehículos es para recorrer distancias cortas ya que no producen ruidos y además no contaminan.

Automóviles híbridos

Aunque no representan un combustible alternativo, los automóviles híbridos son una de las posibles alternativas para un futuro cercano.

El diseño de los automóviles híbridos permite aprovechar los aspectos más positivos de los motores de gasolina o gasóleo y de los vehículos eléctricos, evitando así las desventajas respectivas de cada uno por separado.

Gracias a la recarga semicontinua que se produce durante la conducción, las baterías pueden ser mucho más pequeñas y consecuentemente más baratas que en un vehículo enteramente eléctrico.

Aunque el coste se ve incrementado así como su peso a causa de algunas sofisticaciones tales como el frenado regenerativo.

Estos automóviles son eficientes si se usan en ciudad, cuando las aceleraciones y las paradas son frecuentes. Para largos recorridos donde se mantenga una velocidad alta y uniforme, estos vehículos no ofrecen ninguna ventaja con los existentes actualmente.

Metanol y dimetiléter (DME)

Tales combustibles se obtienen del gas natural. El metanol se puede usar en motores de gasolina y el DME es un sustituto del gasóleo.

El metanol ofrece pocas ventajas sobre el gas natural. Su almacenamiento en los vehículos es más fácil ya que se encuentra en estado líquido.

En comparación con el uso directo del gas como combustible, cabe señalar que la pérdida de energía que se registra en la transformación de metano en metanol reduce la eficiencia de conjunto e incrementa las emisiones globales de dióxido.

La alta toxicidad del metanol lo hace poco atractivo como combustible de automoción.

El DME posee unas propiedades físicas similares a las del GPL, es gaseoso a temperatura ambiente, pero se licua al ser sometido a varias atmósferas de presión. Al ser un combustible adecuado para motores diesel ofrece una eficacia mayor y hace compensar la energía invertida en el proceso de transformación de gas natural en DME.

El uso del DME como combustible de automoción de motores diesel es equiparable al gas natural en motores de gasolina en lo que respecta a las emisiones de gases de efecto invernadero.

Además tiene otras ventajas, como su gran facilidad para licuarse. Su combustión es más limpia que la del gasóleo, plantea menos problemas en los equipos de control de emisiones. Estos beneficios han suscitado el interés de los fabricantes de camiones y autobuses.

Combustible diesel producido a partir del gas natural

Mediante la síntesis Fischer Tropsch se obtiene este tipo de combustibles. Es un complemento extraordinario para el gasóleo convencional. Sobre todo si no se tiene cerca un lugar de producción de gas natural.

La transformación del gas natural en combustible diesel sigue una serie de etapas que requiere un consumo de energía significativo y en las cuales se genera unas emisiones de dióxido carbónico considerables.

Ofrece ventajas respecto a la seguridad del abastecimiento ya que amplía las posibilidades de suministro de combustible de automoción y además se consigue una buena mezcla de gran índice de cetano.

Gas licuado de petróleo (GLP)

Este combustible se ha utilizado durante décadas. Se obtiene mediante la destilación del petróleo o a través de condensado de gas natural, la fracción que se separa del metano durante la producción de tal gas. Las cantidades resultantes dependen del tipo de petróleo crudo, de la clase y grado de refinamiento y de la especificidad de cada yacimiento.

El GLP es barato y respetuoso con el medioambiente, pero a medida que avanzan los tiempos, la gasolina y el gasóleo van adquiriendo el mismo grado de limpieza.

El GLP es usado como materia prima en la industria química y para otros usos específicos. La gasolina convencional también contiene butano, que es uno de los componentes del GLP, pero la producción de GLP a partir de fracciones más pesadas del petróleo carece de sentido respecto al objetivo de conseguir mayor seguridad del abastecimiento y también respecto a la reducción de emisión de dióxido de carbono.

Por ello se debe limitar su uso para el transporte y sólo a través del GLP disponible de forma natural.

1.7 Conclusiones

De toda la amplia gama de combustibles alternativos y tecnologías posibles, las tres opciones que se indican a continuación muestran un potencial de gran envergadura, superior, en cada caso, al 5% del consumo total de combustibles de transporte) para los próximos veinte años:

- Biocarburantes
- Gas natural
- Hidrógeno/pilas de combustible

1.8 Reparto actual de diversos tipos de combustibles en la UE y potencial para el uso de biocarburantes

Tipos de combustibles existentes en el mercado

Los biocarburantes para transporte podrían comercializarse en estado puro para vehículos especialmente adaptados o en forma de mezcla con otros combustibles en una proporción que no afecte al rendimiento de los motores. Entre los biocarburantes disponibles cabe destacar el biodiesel, el bioetanol y el ETBE (etil ter-butyl éter) producido este último a partir del bioetanol.

Otros posibles biocarburantes son el biogás, el biometanol, el biodimetiléter y los bioaceites. Aunque en para éstos sirva el motor convencional para gasolina o diesel, se ha de tener en cuenta la posible necesidad de recipientes especiales para su transporte.

El bioetanol puede utilizarse como combustible de automoción por si solo o en una mezcla con los carburantes convencionales. Técnicamente, la mayor parte de los vehículos matriculados en la UE pueden funcionar con una mezcla de combustible que presente una proporción de bioetanol de hasta el 15%.

El biodiesel se utiliza en estado puro o mezclado con gasóleo convencional. En la actualidad, Alemania, Austria y Suecia utilizan biodiesel al 100% en vehículos especialmente adaptados.

En Francia el biodiesel se mezcla al 30% y al 5% con gasóleo normal. En Italia se mezcla al 5% con gasóleo normal.

El ETBE se obtiene por síntesis del bioetanol y puede utilizarse como aditivo a la gasolina en proporciones de hasta el 15%.

El biogás producido por fermentación anaerobia de la biomasa o de la fracción biodegradable de los residuos puede refinarse hasta alcanzar la calidad del gas natural, lo cual permite su uso en motores de gas utilizados para el transporte.

El biometanol producido a partir de la biomasa o de la fracción biodegradable de los residuos es equivalente al metanol fósil, por lo que puede utilizarse como combustible para el transporte en las mismas condiciones que éste.

El biodimetiléter es un combustible de calidad similar a la del gasóleo, producido a partir de la biomasa o de la fracción biodegradable de los residuos para su uso como biocarburante.

El bioaceite es un carburante que se obtiene por pirólisis de la biomasa y que puede usarse como combustible diesel normal.

Situación actual en Europa

La situación de los biocarburantes dentro de Europa varía de forma muy considerable de un lugar a otro. Austria y Francia son los países más activos en este ámbito.

Francia, donde el sector de las plantas oleaginosas y proteaginosas estaba en decremento, ha hecho un esfuerzo por alzar tales mercados mediante el uso de nuevos combustibles como el aceite de colza, el biodiesel. Se han realizado estudios experimentales con los ésteres de colza y de girasoles.

Austria fue uno de los primeros países en los que se puso en marcha un programa de bioenergía. La primera planta de producción industrial de biodiesel en el mundo se hizo en este país.

En la actualidad Alemania es el segundo productor de biodiesel. Produce unas 130 kT que representa el 15% del consumo total de biocarburantes de la UE.

En Suecia se espera que durante los próximos 30 años el combustible consumido de biocarburantes se encuentre entre el 25 y el 50%. Y éstos se obtendrían a partir de los residuos forestales y agrícolas.

En el año 2000, la producción sueca de biocarburantes fue de 50 kT. Con los rendimientos actuales sería posible producir 500.000 m³ de bioetanol a partir de los excedentes de trigo con que cuenta el país.

El gobierno de este país invierte en la investigación para obtener bioetanol a través de la celulosa de la paja.

En Italia se registró una producción de 96 kT en el año 1999.

En el año 200, la producción de España se situó en unas 50 kT. Los biocarburante líquidos están incluidos en el plan nacional, donde se reconoce el valor de éstos desde el punto de vista del desarrollo rural y de la creación de empleo.



Fig.25 Surtidor de biocarburantes

ANEXO 2

BIOETANOL

2.1 Características generales

El bioetanol se utiliza en vehículos como sustitutivo de la gasolina, bien como único combustible o en mezclas.

Se puede ver que el bioetanol es una apuesta fuerte para el futuro de los combustibles. A continuación se demuestra su influencia positiva en muchos campos:

Con lo que respecta a la economía, un desarrollo de tal combustible haría desaparecer al monopolio de las industrias petrolíferas, y con ello el precio de los combustibles fósiles bajaría. El bioetanol se puede usar para la producción de electricidad, para la obtención de energía térmica y de frío.

Si se evoluciona en el campo científico, fundamentalmente en el estudio de la microbiología, bioquímica, ingeniería genética y química, se podrían obtener mejores rendimientos y nuevos procesos de producción de etanol.

Respecto del medioambiente, el bioetanol colabora con la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que hay que tener en cuenta que la fuente principal de dióxido de carbono es a causa de los automóviles.

En el ámbito económico-social, los biocarburantes ofrecen salidas a los productos agrícolas que habían quedado estancados. Se podría favorecer especialmente a países en vías de desarrollo en la zona ecuatorial, donde el clima beneficia el cultivo, y así se crearían nuevos puestos de trabajo y se industrializarían zonas eminentemente agrícolas.

La fabricación de bioetanol corta la dependencia con los países productores de petróleo.

2.2 Incidencias y aplicaciones del bioetanol

Se denomina bioetanol al alcohol etílico deshidratado (99,4 % de pureza) utilizado en motores de ciclo de Otto que sustituyen a la nafta en forma parcial o total. Estos alcoholes tienen mayor octanaje, debido al alto contenido de oxígeno.

Se puede obtener de las siguientes fuentes:

- Materias ricas en sacarosa como la caña de azúcar, la melaza u el sorgo dulce.
- Materias ricas en almidón como los cereales (maíz, trigo, cebada,...) y los tubérculos (yuca, camote, patata, malanga...)
- Materias ricas en celulosa como la madera y los residuos agrícolas.

Para poder utilizar el bioetanol como combustible puro (E100) se necesita llevar a cabo algunas modificaciones dentro del motor. Estas son las siguientes:

- Aumentar la relación de compresión
- Variar la mezcla de combustible/aire

- Bujías resistentes a mayores temperaturas y presiones
- Conductos resistentes al ataque de alcoholes
- Se debe agregar un mecanismo que facilite el arranque en frío

En el único país donde se ha llegado al uso de este modelo ecológico de motor, que funciona con el E100, es en Brasil. En este país se viene utilizando desde hace 20 años y el número de vehículos ecológicos asciende a unos cuatro millones.

Un biocarburante derivado del bioetanol es el ETBE, como ya se dijo el capítulo anterior, que se obtiene por destilación del petróleo.

Este biocarburante tiene algunas ventajas, es menos volátil que el bioetanol y más miscible con la gasolina.

Tanto el bioetanol como el ETBE se adicionan a la gasolina en proporciones del 10 al 15% y aumentan así la calidad de ésta, ya que el número de octano se incrementa y así se evita añadir sales de plomo para conseguir tal fin.

El bioetanol se está usando en Europa como aditivo de la gasolina y también como sustitutivo del MTBE de origen fósil. Éste se estaba usando como aditivo a las gasolinas sin plomo.

Otras de las incidencias del uso del bioetanol están relacionadas con el realce y resurgimiento de la industria azucarera.

La industria azucarera, de remolacha o de caña de azúcar, atraviesa desde hace ya varios años una crisis difícil de resolver hasta este momento. La falta de diversificación en sus productos crea un mercado duro, de fuertes competencias donde las perspectivas para las escalas de producción media y baja se tornan oscuras.

Sin embargo, para esta industria se abre, en estos tiempos, una innovadora línea para el aprovechamiento de su producción. Se trata de la producción de bioetanol. Esta opción podría garantizar la reindustrialización de distintas zonas azucareras del mundo básicamente agrícolas y generar nuevos puestos de trabajo.

2.3 Bioetanol en España

Los biocarburantes han dejado de ser tema de futuro para convertirse en algo del presente. Actualmente se trata de una producción a pequeña escala pero con potencial para introducirse en el mercado a gran escala.

Muchos automóviles españoles consumen una mezcla de 5% de bioetanol con gasolina.

La planta de producción de Cartagena tiene una capacidad de 80.000 toneladas anuales (50.000 toneladas equivalentes de petróleo al año).

En la Coruña se ha construido otra planta de producción de bioetanol con similar capacidad. Dentro de poco tiempo se abrirá otra en Salamanca.

Otros proyectos como el de la producción de biodiesel se dan en Cataluña, Mallorca, Madrid y Navarra.

España reúne condiciones que le permitirán producir buena parte del etanol que necesitara la UE. La demanda de bioetanol llegará a ser de unos 2,5 millones de toneladas para toda la UE.

La producción en España se hará a través de los excedentes derivados de la agricultura, de la industria vinícola, a partir de la remolacha y cereales

Se sabe que no toda la producción de alcohol puede ir destinada a la obtención de bioetanol pero se ha de tener en cuenta que del 50% de las melazas de remolacha se pueden obtener 838,875 Hl. Además de la producción de bioetanol mediante las plantas de almidón y celulosa.

Para el estudio de un posible proyecto de una planta de bioetanol, se precisa de la siguiente información:

- Tipo de materia prima disponible
- Cantidad anual
- Disponibilidad temporal de la materia prima (una cosecha cada año, producción continuada todo el año)
- Precio de la materia prima puesta en el lugar de la instalación
- Precio de la gasolina en el país
- Existencia de una extensión de impuestos sobre hidrocarburos para la fabricación y comercialización de biocarburantes

Esta tecnología está orientada a potenciar los recursos agrarios internos del país para proporcionar un excelente producto ecológico en la automoción.

ANEXO 3

FERMENTACIÓN

3.1 Aspectos generales del proceso de fermentación

El proceso químico de producción de bioetanol se basa simplemente en una fermentación, que es un cambio químico en las sustancias de naturaleza orgánica llevado a cabo por la acción de enzimas. Lo que ocurre en una fermentación es que las sustancias orgánicas complejas se transforman en otras más simples.

La fermentación es un proceso que realizan muchos microorganismos, efectuando reacciones sobre algunos compuestos orgánicos y liberando energía. Sólo en condiciones fermentativas se da la oxidación parcial de los átomos de carbono del compuesto orgánico y una pequeña cantidad de la energía potencial disponible se libera.

Un proceso de fermentación típico es un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que las actividades catabólicas y anabólicas.

Los dos fenómenos, crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso de forma simultánea o no según sea el caso a estudio.

Los objetivos de un fermentador son maximizar la producción del producto deseado. Es decir, se desea que la mayor cantidad de nutrientes sean convertidos en microorganismos o en alcohol.

El tipo de fermentación más importante es la fermentación alcohólica, en la que los azúcares simples, como la glucosa, se transforman en alcohol etílico y dióxido de carbono. Todo esto llevado a cabo bajo la actividad de unos determinados microorganismos que trabajan en condiciones microaerobias.

Además de esta clase de fermentación donde el objetivo es producir alcohol, existen otras con fines médicos, farmacéuticos... además de los procesos de producción y desarrollo de los mismos microorganismos.

3.2 Características de las reacciones biológicas

El diseño del reactor deberá obedecer a las demandas propias de todo reactor químico más las específicas del proceso biológico.

Es importante tener en cuenta las características cinéticas, termodinámicas y de transferencia de materia de las reacciones biológicas. Estas son las que siguen a continuación.

- Las reacciones biológicas son procesos generalmente lentos en comparación con las reacciones químicas. Por ello sus constantes de tiempo se suele medir en horas e incluso en días.

- Los procesos fermentativos tienen un carácter autocatalítico, en la reacción entre el sustrato y los microorganismos resulta además del producto, etanol, más microorganismo, catalizadores del proceso.
- La actividad específica de los biocatalizadores es baja frente a los catalizadores químicos, por ello la reacción biológica es más lenta.
- Son procesos que dependen de forma importante de las condiciones de operación, como el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto,...
- Pueden presentar problemas de inhibición por productos y/o sustratos dependiendo de las condiciones de operación y concentraciones de trabajo.
- La naturaleza del biocatalizador puede variar conforme se desarrolla el proceso de fermentación, es decir, las células pueden perder actividad por causa de la inhibición provocada por algún factor o por lo contrario aumentar tal actividad si los microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones del medio. Esto último sucedería si se da la mutación natural de tales levaduras o bacterias.
- La producción del etanol está condicionada a los parámetros utilizados de pH, temperatura... ya que el metabolismo de los microorganismos dependen de tales parámetros y las reacciones secundarias pueden tomar mayor relevancia y así hacer disminuir la concentración del etanol.
- En todas las reacciones biológicas las entalpías de reacción son bajas por lo que el diseño de los equipos de intercambio de calor no supondrá problema de consideración.
- La energía de activación de la reacción es importante por ello en algunos rangos de temperatura la velocidad de reacción depende fuertemente de la temperatura de operación. La desactivación también se ve muy influenciada por la temperatura.
- En los procesos fermentativos la temperatura y la presión son moderadas.
- Es muy importante conseguir un buen contacto entre las diferentes fases, así la limitación por transferencia se hace despreciable.
- Las propiedades reológicas del fluido pueden variar durante el proceso. Algunas veces el fluido no presenta un comportamiento Newtoniano. En el caso a estudio esto no ocurre así. Este régimen no Newtoniano se da en el uso de microorganismos con facilidad de crear agregados y formas así partículas mayores. Los llamados flóculos.
- En las operaciones de fermentación es necesario la separación final del producto.

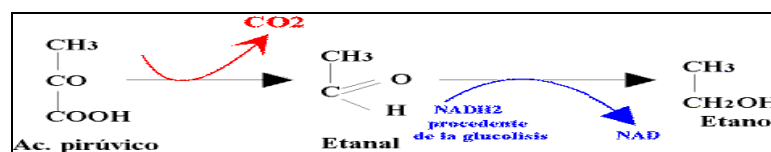


Fig.26 Reacción de generación de etanol

3.3 Efectos internos y externos que afectan a la fermentación

Existen efectos internos y externos que pueden modificar el rendimiento global del proceso. Por un lado, haciendo referencia al comportamiento de un microorganismo en crecimiento, los efectos internos estarán relacionados con su genética y sus mecanismos de regulación metabólica.

Estos mecanismos pueden ser transformados por los efectos externos, los que se dan en el medio de fermentación.

Los efectos internos se pueden variar mediante la ingeniería genética.

Los efectos externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los reactores como puede ser la temperatura, el pH, la agitación, la aireación,...

La modificación de algunos de los efectos físicos puede influir de manera notable sobre el proceso. Si por ejemplo se modifica la temperatura y su valor no es el adecuado para el desarrollo de la actividad de los microorganismos, el rendimiento global del proceso se vería mermado.

Los efectos externos de naturaleza química están representados por la presencia de los componentes de los medios de fermentación, además del oxígeno, que puede considerarse un nutriente más.

Todos estos componentes deben cumplir con los requerimientos nutricionales de los microorganismos, y también con los requerimientos específicos para que se desarrolle la actividad concreta a realizar. En este caso, la producción de etanol a través de metabolizar la sacarosa.

Los reactores están también estrechamente vinculados al manejo o manipulación de los efectos externos, ya que además de la regulación de las variables físicas, permite operar de un modo u otro, y así controlar y fijar la alimentación de sustrato.

Se podrían esquematizar los factores que afectan a las fermentaciones, ya que además del tipo de microorganismos utilizado para ésta, se deben tener en cuenta las condiciones que hagan alcanzar una conversión efectiva del sustrato en el producto deseado.

Algunos de estos factores son:

- Regulación de la síntesis de enzimas: este factor es muy importante durante la etapa de crecimiento celular. Cada célula tiene la capacidad de producir una gran cantidad de enzimas que deben generarse en forma coordinada para que el microorganismo funcione de manera eficiente. La regulación del metabolismo celular se ve influenciado por factores como la síntesis y degradación de enzimas, la represión catabólica, la modulación de la actividad enzimática, entre otros.
- Mutación: en ocasiones, el rendimiento de las bioconversiones puede mejorarse por la mutación del microorganismo con el fin de que éste produzca mayor cantidad de enzimas para así generar más producto deseado. Los microorganismos genéticamente alterados después de mucho reproducirse tienden a volver a la cepa original.

- **Permeabilidad:** Para muchos microorganismos se hace necesario la alteración de la permeabilidad de su membrana celular hacia determinados sustratos o productos.
- **Cometabolismo:** consiste en la utilización de dos sustratos. Uno se emplea para el crecimiento y manutención del microorganismo, mientras que el segundo es convertido en el producto deseado. Esta técnica se usa cuando los sustratos requeridos son muy costosos o cuando un solo sustrato no abastece de forma adecuada las necesidades de los microorganismos.
- **Inhibición por producto:** un problema en las biotransformaciones es la inhibición por producto, debido a que cuando se forma el compuesto de interés la velocidad de generación de producto disminuye. En el caso particular de la fermentación alcohólica mediante la *Saccharomyces Cerevisiae*, se puede producir etanol hasta una concentración de 12 a 14%v/v aunque se ha logrado obtener cepas que aguanten concentraciones de hasta el 18%v/v. Los factores fisiológicos que influyen en la tolerancia de las levaduras al etanol son el aporte del sustrato, la acumulación de etanol intracelular, la presión osmótica y la temperatura.
- **Temperatura:** de forma análoga a las reacciones químicas y enzimáticas, el crecimiento celular sufre alteraciones por la temperatura. La temperatura a la cual prolifera un microorganismo depende de la naturaleza psicrófila, mesófila o termófila. El efecto de la temperatura sobre la velocidad de crecimiento puede representarse mediante la ecuación de Arrhenius. Para el caso de la *Saccharomyces Cerevisiae* la velocidad de fermentación aumenta con la temperatura entre los 18 y los 35°C. Por encima de los 35°C se corre el riesgo de la proliferación de bacterias, ya que a estas temperaturas las membranas celulares de las levaduras dejan de ser tan selectivas y emiten sustratos muy adecuados para el desarrollo bacteriano.

3.4 Esquema de un proceso industrial

En un proceso industrial de fermentación suelen existir cuatro etapas bien diferenciadas. La primera tiene relación con la propagación del cultivo, en la segunda se da el proceso de fermentación. Las operaciones de separación y purificación del producto se dan en la tercera fase y la última corresponde al tratamiento de efluentes.

La propagación del cultivo se realiza en el laboratorio. Se suele realizar partir de un tubo de ensayo que contiene un repique reciente del microorganismo o de una muestra congelada o liofilizada donde se conserva la cepa de interés. También se realiza a través de una colonia del microorganismo previamente seleccionada. Este material microbiológico elegido constituye el punto de partida con el cual se debe aumentar la cantidad del mismo mediante sucesivos pasajes en frascos de volúmenes crecientes. Estos últimos recipientes de mayor capacidad son tanques con un mecanismo de agitación de vaivén o rotatorios que se encuentran en cámaras de cultivo.

La segunda fase relacionada con la fermentación se hace a través del material obtenido de la primera fase. Se siembra el tanque de inóculo que puede tener un volumen de 50, 500 ó 1000 litros según la escala industrial posterior.

Del tanque de inóculo se pasa posteriormente al fermentador industrial cuyo volumen, que varía de acuerdo al producto a obtener y a su concentración, está comprendido comúnmente entre 10.000 y 100.000 litros.

Un proceso esencialmente ligado a la producción es la preparación y esterilización de los medios, estas operaciones se llevan a cabo también en esta fase. Se ha de realizar previamente a la inoculación del sustrato.

En la preparación del medio fermentativo se suelen añadir macronutrientes y micronutrientes que favorezcan la reacción deseada. Con la esterilización se consigue evitar la contaminación por invasión de otros microorganismos extraños al proceso.

La tercera fase correspondiente a las operaciones y procesos de separación y purificación de los productos, comprende de forma general las siguientes etapas:

- Separación de insolubles por filtración, centrifugación o decantación.
- Separaciones primarias por extracción, adsorción, absorción, ultrafiltración.
- Purificación por extracción líquido-líquido, extracción a dos fases acuosas o cromatografía por afinidad.
- Aislamiento del producto.

La última fase no tiene nada que ver con el producto de fermentación, pero es muy importante, ya que controla la calidad del efluente que sale de la fábrica y que normalmente es enviado a un curso de agua, canal, arrollo, río o al mar.

Es importante tener en cuenta que todas las etapas de un proceso de fermentación deben estar íntimamente relacionadas e integradas para que el proceso sea globalmente optimizado.

Se ha de tomar una cepa de gran calidad para maximizar la producción. El sustrato seleccionado debe ser idóneo y cumplir unas pautas de esterilización.

La aireación y la agitación del proceso también debe ser diseñada.

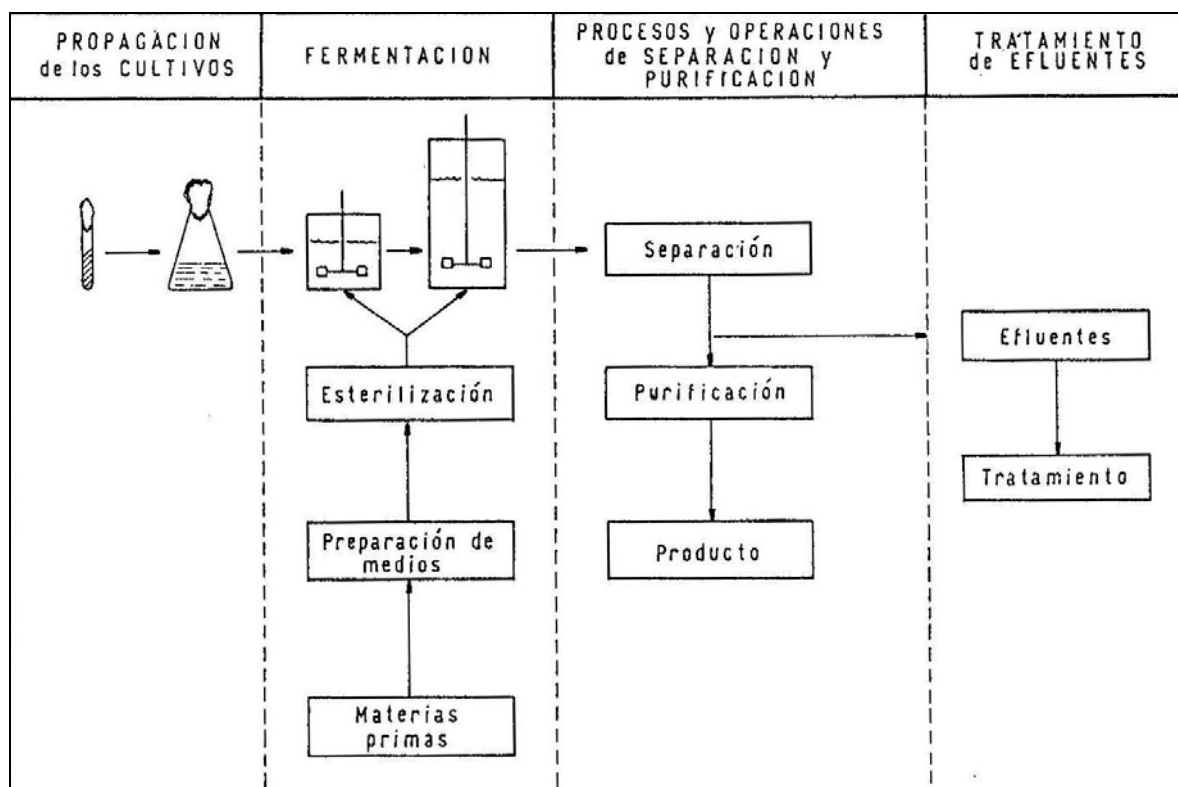


Fig.27 Esquema de un proceso industrial

ANEXO 4

MICROORGANISMOS

4.1 Tipos de microorganismos con aplicación industrial

Se llama microorganismo a todos los organismos microscópicos que existen como células aisladas o agrupaciones celulares independientes de su estructura celular.

Algunos microorganismos son utilizados en procesos industriales.

Para que un microorganismo sea de interés industrial, este debe cumplir serie de condiciones que hagan que su uso resulto rentable.

Su crecimiento en un medio de cultivo económico debe ser rápido. Debe ser un cultivo puro con capacidad de reproducirse en las condiciones de laboratorio y de la planta industrial. Una característica importante es la susceptibilidad a la manipulación genética para conseguir así una mutación más rentable y optimizar el proceso.

Se pueden considerar microorganismos a las bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas.

En este estudio se empleará un tipo de microorganismo específico, perteneciente a la familia de los hongos. Se trata de la levadura, y dentro de esta especie, se usará la *Saccharomyces Cerevisiae*.

Las levaduras son microorganismos pertenecientes al grupo de las criptógamas, dentro de los hongos. Son incapaces de emplear la fotosíntesis para su alimentación. No poseen flagelos por lo que las células individuales son inmóviles entre sí. Son capaces de transformar los hidratos de carbono en alcohol con desprendimiento de dióxido de carbono.

Las levaduras son hongos unicelulares que se han usado durante siglos para la producción de vino, cervezas, licores y también para la obtención de pan.

Estos organismos metabolizan los azúcares y los transforman en productos cotizados industrialmente. Este proceso se llama fermentación, que es el cambio de las sustancias orgánicas complejas a otras más simples producidas por la acción de las enzimas.

En los procesos donde se requieren estos tipos de microorganismos se pueden usar también las enzimas extraídas de tales seres microscópicos y así desarrollar el proceso a través de las reacciones enzimáticas en vez de biológicas.

Todas las levaduras son capaces de metabolizar los azúcares como la glucosa, fructosa y manosa. Pero existen algunas que también son capaces de hacerlo en condiciones anaeróbicas, y este proceso es el llamado fermentación.

En la fermentación los azúcares simples son transformados en alcohol etílico y dióxido de carbono. Esto es la fermentación alcohólica.

La mayoría de las levaduras que se cultivan para este proceso son del género *Saccharomyces*, concretamente la especie ***Saccharomyces Cerevisiae***.

Cuando estas cepas son utilizadas para la fabricación de pan, usos médicos o para la fabricación de alimentos, el medio de cultivo en donde han crecidos dichas levaduras carece de interés y es considerado un residuo después de haber sido usado.

Por lo contrario, en el proceso de fermentación alcohólica el medio de cultivo es el producto final y las levaduras contenidas en tal producto líquido son filtradas para ser reutilizadas o desechadas.

Tabla 2. Clasificación de los microorganismos según la temperatura

Tipos	Rango	Óptimo
Termófilos	25 - 80 °C	50 - 60 °C
Mesófilos	10 - 45 °C	20 - 40 °C
Psicrófilo	-5 - 30 °C	10-20 °C

Tabla 3. Clasificación microorganismos según el pH

Tipos	pH externo	pH interno
Acidófilos	1.0 - 5.0	6.5
Neutrófilos	5.5 - 8.5	5.5 - 8.5
Alcalófilos	9.0 - 10.0	9.5

4.2 Selección de la biomasa. *Saccharomyces Cerevisiae* y *Zymomonas Mobilis*

El éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, para la selección del mismo se deberán tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación:

- La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.
- Su velocidad de crecimiento deberá ser alta.
- La cepa debe estar libre de contaminantes, incluidos fagos.
- Sus requerimientos nutricionales deberían ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
- Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
- Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.
- Si el objetivo del proceso es un producto, éste debería ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas.

En algunos casos se dispone de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios.

En este estudio se obtuvieron del departamento de genética de la facultad de biología. Estas cepas estaban contenidas en una caja de petri y fueron sacadas del congelamiento a través de nitrógeno líquido.

La **levadura** de la especie *Saccharomyces Cerevisiae* es la más utilizada en la fermentación de los azúcares a etanol ya que de forma eficaz transforma los azúcares de seis carbonos en etanol. Pero el sustrato orgánico vegetal además de tener hexosas como la glucosa también tiene pentosas como es el caso de la xilosa. Los azúcares de cinco carbonos no son metabolizados por las levaduras y como consecuencia no son utilizados como fuentes de carbono.

Esto hace disminuir el rendimiento del proceso ya que parte de los azúcares presentes en el medio de cultivo no se pueden transformar a etanol.

Para ello se podría recurrir al uso de otros microorganismos que fuesen capaces de aprovechar tales pentosas pero se requerían dos tanques de fermentación individuales y el coste global del proceso aumentaría considerablemente.

Una opción actualmente utilizada es la modificación genética de esta especie de levadura mediante la ingeniería biomolecular.

Se le introduce a la levadura *Cerevisiae* genes de otras levaduras que sí son capaces de metabolizar los azúcares de cinco carbonos.

Mediante estas **mutaciones** incitadas se consiguen levaduras más eficaces.

Día tras día se promueven investigaciones en el desarrollo de levaduras más eficaces en los procesos de fermentación y también se invierte en la búsqueda de un sustrato barato y de alto rendimiento.

Así se ha descubierto una **bacteria** bastante eficaz llamada ***Zymomonas mobilis***.

La descripción fenotípica de *Zymomonas* corresponde a los siguientes puntos:

- Bastón gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo.
- Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofotricos
- Arreglo celular peomorfico (cadenas, rosetas, filamentos)
- Ausencia de esporas, de cápsulas y constituyentes de almacenamiento celular.
- Catalapsa positiva y oxidasa negativa.
- Anaeróbico y microaerofílico.
- La utilización de sacarosa es inducible y puede ir acompañada de formación de levanas.
- Las únicas fuentes de carbono que metabolizan son: glucosa, fructosa y sacarosa.

La *zymomonas mobilis* forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales.

A parte de estas características físicas, lo más importante es su comportamiento frente a las condiciones del proceso. Es decir, cómo se comporta ante una alta concentración de azúcares, alcohol, ante la temperatura,...

La *zymomonas* es capaz de crecer en un amplio intervalo de temperaturas, desde los 25°C hasta los 45°C. Pero su temperatura óptima está acotada en un rango menor de temperaturas, entre los 30-35°C.

Cuando se opera a temperaturas mayores de los 30°C, la producción de etanol y de biomasa se ve afectada. La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición y la fluidez de la membrana celular.

A altas temperaturas la fluidez de la membrana disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados, favoreciendo así la acumulación de etanol en el interior de las células.

Es decir, a altas temperaturas se favorece el efecto inhibitor del etanol ya que al encontrarse depositado dentro de la célula se amplifica la inhibición.

El etanol tiene grandes consecuencias sobre la composición de la membrana celular.

A través de las investigaciones realizadas se ha demostrado que el efecto que tiene la adición externa de etanol o el propio formado por las células causas un efecto inhibitor mayor sobre el crecimiento celular que sobre la producción de etanol.

Este hecho es importante porque si se pretende regular el crecimiento celular se puede aumentar la concentración de alcohol etílico en el medio de cultivo.

El oxígeno causa una disminución en la producción de etanol ya que las altas concentraciones de oxígeno disuelto incitan la formación de subproductos fermentativos. El efecto inhibitor del oxígeno está ligado a la concentración de los sustratos.

El comportamiento de la levadura ante la temperatura depende de la naturaleza de ésta.

La selección de este parámetro influye tanto en los factores fisiológicos como en los problemas físicos derivados, pérdidas por evaporación de etanol al trabajar con temperaturas elevadas.

Se debe de tener en cuenta que para cada levadura existe una temperatura óptima en la cual muestra su máxima actividad. Además existe una zona independiente de la temperatura óptima donde la levadura aún presenta actividad.

A medida que la temperatura de operación se aleja de la óptima, se reduce considerablemente la actividad de dicha levadura, haciendo disminuir el rendimiento global del proceso.

Cuando se sobrepasa el mínimo o el máximo del rango de temperaturas de trabajo de los microorganismos, las levaduras permanecen en estado latente. Para toda levadura si se sobrepasan los 55°C durante un tiempo mayor a los cinco minutos se produce la muerte.

Para la *Cerevisiae* su desarrollo óptimo está entre los 28-35°C. Siendo la optima los 30°C.

La levadura es afectada en alto grado por la concentración de alcohol. Una concentración alcohólica superior al 3% ya influye en el crecimiento. Una concentración sobre el 5% influye tanto en el crecimiento como en la fermentación.

Cuando la concentración de etanol alcanza el 10% se produce una paralización total en el crecimiento.

El pH es un factor bastante importante en el proceso de fermentación ya que controla la contaminación por microorganismos extraños al proceso. Además también influye en el crecimiento de la levadura y en la producción de etanol.

Durante el proceso la levadura toma nitrógeno de los aminoácidos orgánicos perdiendo así su carácter anfótero y pasando a ácido.

Esto causa una reducción del pH en el medio. Cuanto menor sea el pH del medio menor es la probabilidad de contaminación, ya que se hace un medio hostil para posibles microorganismos extraños que quieran crecer allí.

Pero a medida que el pH se hace menor la fermentación se hace más lenta porque las levaduras no se desarrollan adecuadamente.

El rango de pH para las Cerevisae es de 4,4-5,5 siendo el óptimo de 4,5 para su crecimiento.

La presencia de sustancias nutritivas en una concentración considerable es una condición necesaria en el crecimiento celular, mantenimiento de los microorganismos y en la producción del etanol.

Las principales sustancias nutritivas son carbohidratos, nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas y trazas de algunos elementos.

El suministro de oxígeno en todo proceso fermentativo es vital, como ya se explicará en apartados posteriores.

El crecimiento se ve influenciado de forma muy positiva por una buena aireación.

Las cantidades de aire que se precisan para la producción de levadura varían entre los 0,017 y 0,033 m³ de aire por gramo de levadura conteniendo esta última un 30% de materia seca.

Al inicio de la fermentación la potencia de aireación no debe de ser muy intensa ya que en estos instantes iniciales la concentración de alcohol es pequeña y el medio se hace susceptible de ser infectado por microorganismos como los mohos, atacando a las levaduras del cultivo. Los efectos de aireación son más críticos operando en continuo debido a la necesidad de mantener el crecimiento de las levaduras y además el de procurar una velocidad de fermentación satisfactoria.

Ambos parámetros aumentan y disminuyen en sentido contrario, al aumentar la concentración de oxígeno se mejoran las condiciones para el crecimiento de la biomasa pero esto hace que el sustrato invertido en la producción de etanol disminuya, consiguiendo de tal forma reducir la eficiencia de la producción del etanol.

Es claro que al inicio el caudal de aire suministrado será pequeño aumentado en una etapa posterior cuando el pH disminuye y el medio se hace más hostil. Después, cuando el proceso ya es avanzado se debe introducir un caudal menor de oxígeno.

Si se comparan ambos microorganismos, La Zymomonas Mobilis con la Saccharomyces Cerevisiae se puede demostrar que existen algunas ventajas de la primera sobre la segunda. También se dan desventajas.

Las ventajas son las siguientes:

- La tolerancia osmótica a concentraciones superiores de azúcares con un máximo de 400 g/l. En el caso de la levadura su límite máximo de concentración de azúcar es de 1 g/l. Esto hace que el proceso sea más rentable ya que si hay más sustrato hay más producción de etanol y más rápido crecimiento celular.
- También tiene una tolerancia mayor al etanol, con un máximo en 130 g/l. El etanol actúa como un producto inhibitorio para la actividad de las levaduras y de las bacterias. A medida que avanza el proceso la actividad de las células se ve disminuida por el aumento considerable del etanol en el medio, llegándose a una concentración crítica que inhibe completamente el crecimiento de las células.

Las levaduras son más sensibles al etanol que las clases bacterias Zymomonas.

Como dato las levaduras son inhibidas más fuertemente por los alcoholes producidos por ellas mismas que por la adición de alcohol desde una fuente exterior.

- Las *Zymomonas* tienen una velocidad de crecimiento mayor, 0,27 $\mu\text{m/s}$ frente a 0,13 $\mu\text{m/s}$ de las *cerevisiae*.
- El metabolismo anaerobio de los carbohidratos se lleva a cabo a través de la vía de Entner Doudoroff en donde solo se produce un mol de ATP por mol de glucosa utilizada. Esto significa que existe una reducción de la cantidad de glucosa que se convierte en biomasa en lugar de etanol, así que hay un mayor rendimiento en la producción del alcohol. Todo esto indica que el factor de conversión de sustrato a producto es más alto en las *Zymomonas* siendo su producción de células menor.
- El rango de pH óptimo es más amplio, siendo éste de 5-7.
- Y la temperatura óptima es más alta, llegando su valor máximo a 37°C.

Pero aparte de todas estas ventajas, las bacterias tienen una capacidad de reutilización menor. Además estas comparaciones se hacen de forma general y no se especifica las cepas concretamente. La cepa usada en este estudio pertenece a la familia de la *saccharomyces* y cumple con más exigencias los parámetros de operación que la bacteria *zymomonas*.

Según todo esto se busca un microorganismo con resistencia al alcohol ya que así se pueden obtener productos más puros, haciendo más económica la destilación ya que habrá menor consumo de combustible. Como mínimo debe permitir valores del 8-9% de alcohol en volumen. También debe de ser resistente a la acidez, este parámetro podrá aumentar para evitar infecciones. Y su resistencia a los cambios de temperatura es fundamental.

La cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* IFI 256 cumple todas estas características de forma eficiente, aguantando pH comprendidos entre 4,5 – 4,0. Su temperatura óptima de trabajo es de 32°C. Aguanta altas concentraciones de azúcares, 22%v/v. También soporta altas cantidades de alcohol.

La levadura del tipo *Saccharomyces Cerevisiae* permite una conversión aproximada del 85% al cabo de 32 horas y del 90% al cabo de 75 horas en la producción de etanol.

Su porcentaje en peso de carbono es del 45%, de oxígeno el 30,6%, de hidrógeno el 6,8% y de nitrógeno el 9%.

Si las condiciones de crecimiento son anaeróbicas el mantenimiento es de 0,036 gramos de células por gramo de sustrato y hora.

Sin embargo en condiciones aeróbicas la energía de mantenimiento es mucho menor, 0,022 gramos de células por gramos de sustrato y hora.

4.3 Mantenimiento de los cultivos

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos:

- Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- Preservar los niveles de su productividad inicial.
- Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad.

Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación.

Tanto para el mantenimiento, preparación y propagación de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no produzcan variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada.

Los métodos de preservación o mantenimiento más importantes se describen a continuación.

El subcultivo es un método común de conservación, que consiste en el repique periódico del cultivo en un medio nutritivo fresco. El intervalo de transferencia varía con el microorganismo, debiendo considerarse el medio adecuado para cada especie.

Una vez desarrollados los cultivos se mantienen a 4 °C durante periodos que oscilan entre 15 días y 2 meses.

Los inconvenientes que presenta son varios:

- Incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismo.
- Riesgo de contaminación.
- Alteraciones en el medio de cultivo, durante la etapa en frío se produce una desecación gradual del mismo.

El Mantenimiento bajo una capa de aceite es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos organismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral o vaselina estéril. Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en heladera por periodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de aparición de mutantes; sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento.

La congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos periodos de tiempo debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura.

La mayor disponibilidad de nitrógeno líquido (-196 °C) y el mejoramiento de los equipos de refrigeración han contribuido en mejorar esta técnica de conservación y hacerla más asequible.

Los cultivos son sometidos a congelamiento en la etapa de crecimiento estacionario, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las de fase exponencial.

Muchos estudios señalan que una velocidad de congelación lenta y una rápida descongelación dan los mayores números de células viables. Dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso.

La temperatura de conservación más baja recomendada es -70 °C, ya que a temperaturas más altas ocurren algunas recristalizaciones, las cuales si son intracelulares son letales para las células.

En caso de nitrógeno líquido, la conservación podría prolongarse por años, asegurando una buena provisión del mismo y disponiendo de equipos con sistemas de alarma en caso de fluctuaciones de temperatura.

El empleo de un soporte de papel para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas.

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

4.4 Biocatalizadores libres e inmovilizados

Las células se pueden encontrar de forma libre dentro del tanque de reacción. Este modelo correspondería al de un reactor de mezcla perfecta, que mediante el sistema de agitación mezclaría el medio de cultivo con dicho cultivo. Dentro del sistema se crearían más células y se generaría el etanol, producto deseado.

Para un instante de tiempo distinto del inicial, se tendría un caldo de sustrato, biomasa y producto. Además se debe de contar con el aporte de oxígeno, es decir, que en aquel instante de tiempo también se tendría una concentración de oxígeno disuelto.

Al ser un tanque de mezcla completa, se supone que tiene una homogenización perfecta, es decir, para dicho instante de tiempo se tendrá una concentración determinada de cada especie válida para todo el reactor.

En este tipo de sistemas las limitaciones de transferencia interna de materia entre las mismas células es despreciable, ya que se encuentran agitadas y la difusión del oxígeno es facilitada.

Es un sistema sencillo, económico y fácil de diseñar. El inconveniente principal que tiene es la dificultad de recuperar las células una vez terminado el proceso, para así poderlas reutilizar mediante una recirculación o conservarlas para procesos posteriores.

Este inconveniente se ve acentuado a la hora de operar en continuo.

Por ello se prefiere la inmovilización de las células en procesos a escala industrial. La eficiencia es mayor.

La inmovilización de un biocatalizador, entendiendo por biocatalizador aquel cultivo de microorganismos o enzimas de interés industrial, consiste en fijar su localización en una región definida del reactor manteniendo al mismo tiempo una actividad catalítica requerida y la mayor viabilidad posible.

Con esto último se quiere decir que cuando se procede a la inmovilización de una cepa, a veces, según el método, se pierde parte de la viabilidad de las células.

La característica general de cualquier sistema con biocatalizadores inmovilizados es la existencia de mecanismos difusionales para el transporte de sustrato y producto. Y si existiese suministro de oxígeno también habría una difusión de éste hacia el biocatalizador inmovilizado.

Las ventajas de la utilización de las células son las siguientes:

- La posibilidad de trabajar en continuo, el biocatalizador se queda retenido en el interior del reactor mientras se mantiene un flujo de entrada y salida de líquido. Así se puede operar con caudales mayores a los correspondientes del límite de lavado cuando se opera con células libres. Esta ventaja hace aumentar la productividad ya que se opera con caudales mayores, con concentraciones de biomasa más altas y de todo esto resulta una mayor conversión de sustrato.

- En sistemas discontinuos la inmovilización favorece la reutilización del biocatalizador.
- Además esta forma de operar permite aumentar sensiblemente la concentración de microorganismos frente a las células que se encontraban en suspensión.
- Se reducen los efectos de contaminaciones accidentales del proceso porque la población de células extrañas que se encuentran en suspensión es fácilmente eliminada respecto a las de interés industrial que se encuentran inmovilizadas y en mayor concentración.

Los inconvenientes son los que se describen a continuación:

- La actividad de una célula puede quedar directamente afectada por las condiciones a las cuales se lleva a cabo el proceso de inmovilización. Esto puede llevarlas a perder parte de su actividad o viabilidad.
- Además los efectos de la velocidad de difusión de materia toman relevancia. Es decir, la velocidad de difusión de los sustratos y productos dentro del sistema de células inmovilizadas puede limitar sus actividades y su eficiencia cuando dicha velocidad sea más lenta que la velocidad de la transformación que se esté dando.
- Desde el punto de vista del proceso global, la incorporación de una nueva etapa al proceso introduce mayor complejidad, y ésta se ha de ver compensada de forma clara con un aumento de productividad y mejoras en las operaciones de separación entre el producto y los microorganismos. También debe aumentar los periodos de operación.
- El uso de estos sistemas de inmovilización dependerá del tiempo de conversión del proceso, de la productividad requerida y de la escala a la cual se esté trabajando. Además también influirá de forma fundamental el tipo de reactor a utilizar, ya que en sistemas con agitación es mucho más difícil contener una fase inmovilizada.

Existen diversos métodos de inmovilización según sean los mecanismos en los cuales se basen.

- Adsorción: Se produce por una interacción de tipo iónico o mediante fuerzas atractivas débiles sobre la superficie del soporte.
- Enlaces cruzados y autoinmovilización: No existe un soporte propiamente dicho sino que las células mediante una interacción directa llegan a inmovilizarse. Este proceso se llama floculación.
- Atrapamiento: A través de la formación de estructuras tridimensionales las células quedan atrapadas de forma uniforme en su interior.
- Sistemas con membranas (microencapsulación, membranas preformadas): En los dos casos el biocatalizador se inmoviliza en el interior de un espacio limitado por una membrana. Las microcápsulas se producen en presencia del biocatalizador y queda incorporado en su interior. En el segundo caso, las membranas preformadas se generan con anterioridad y después se introducen los microorganismos en su interior.

Estos métodos de inmovilización son usados preferentemente en los reactores del tipo de lecho fijo, fluidizado o con membranas.

En menor proporción se usa para reactores de tanque agitado ya que como se dijo anteriormente, la agitación afecta de forma severa a la integridad física de las células inmovilizadas.

4.5 Tipos de sistemas de inmovilización

Inmovilización por adsorción

Se trata del procedimiento más simple y sencillo. Se pone en contacto la suspensión de microorganismos con un adsorbente activo. Después de un tiempo, cuando se ha dado la adsorción de lava el complejo formado para eliminar cualquier microorganismo que no se haya fijado. Las interacciones que favorecen la adsorción son de tipo iónico o enlaces débiles como los puentes de hidrógeno o fuerzas de Van Der Waal. Además si se desarrollan polímeros extracelulares la adsorción se favorece.

Este método de inmovilización es muy suave y no afecta a la viabilidad de las células. El inconveniente más relevante es la reversibilidad del proceso, ya que si existe un cambio en el pH, en las fuerzas iónicas o en la temperatura se puede dar la desadsorción del soporte.

Existen pretratamientos para favorecer la inmovilización.

Se suele hacer en cubos de madera, antracita, piezas de PVC,... El soporte a utilizar debe cumplir una serie de características, tales como: alta capacidad de retención de células para conseguir concentraciones mayores de microorganismos, ser inerte bioquímicamente, resistencia a la tensión y a las presiones ejercidas por los gases generados, permitir la difusividad de los reactantes y los productos formados para minimizar la influencia de las limitaciones por transferencia de masa.

Autoinmovilización

Algunas células tienen la capacidad de formar agregados macroscópicos (flóculos o pellets) con lo que no se requiere la adición de ningún reactivo ni soporte para realizar la inmovilización.

La formación de agregados celulares depende de las condiciones en las que se realiza el cultivo, como la agitación, composición del medio, pH o la concentración de oxígeno disuelto.

Todos estos parámetros afectarán en el mecanismo de agregación de las células, hasta tal punto que células iguales se agregarán de diversa forma si las condiciones son distintas.

Este método de inmovilización depende de si la célula tiene tal capacidad para producirla. Es frágil ante cambios de operación, como la agitación o composición de medio. Se necesitan largos periodos de tiempo para obtenerlos.

Se debe añadir que existen agentes floculantes como el glutaraldehído y el tolueno diisocianato. Estos agentes fomentan la agrupación de células y su consecuente agregación.

Inmovilización por inclusión

Se forma una matriz de tres dimensiones en presencia de las células quedando éstas atrapadas dentro de su estructura.

La naturaleza de la matriz debe cumplir una serie de condiciones como la de retener sin dificultad en su interior al cultivo de microorganismos y la de facilitar la difusión de sustratos y reactivos.

El hecho de que el proceso de formación de la matriz no interaccione directamente con las células hace que se puedan inmovilizar con un % de viabilidad muy elevado, manteniendo

unas condiciones suaves, es decir, controlando la toxicidad, pH, T y concentraciones de reactivos.

Inmovilización por membrana

Existen dos formas de inmovilización basadas en la retención del biocatalizador en un espacio limitado por una membrana semipermeable.

Estas dos formas son las siguientes:

La inmovilización por microencapsulación se usa en presencia de partículas de tamaño pequeño que quedan incluidas en su interior. Estas partículas permanecen en suspensión.

También están las membranas preformadas que se usa para tamaños de partículas mayores. Son membranas fabricadas con anterioridad a la introducción del biocatalizador en su interior.

Las más usadas son las fibras huecas. Este sistema de inmovilización se encuentra fabricado e incorporado dentro del reactor.

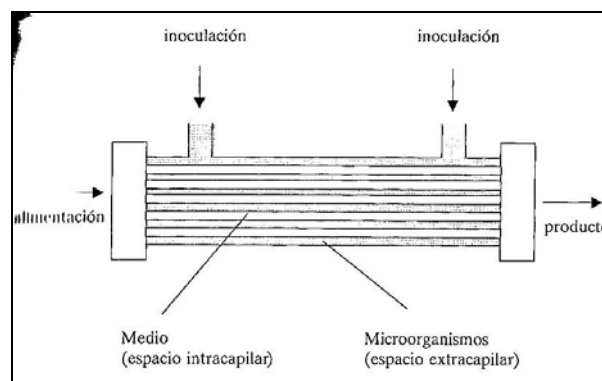


Fig.28 Esquema de un reactor de fibras huecas.

En ambos casos se puede controlar el tamaño de poro y así el transporte de las moléculas a su interior, es decir, se controla qué tipo de células pueden entrar o no, todo ello está en función de su peso molecular.

La microencapsulación permite mantener a los microorganismos suspendidos en el medio líquido y al mismo tiempo separados del medio exterior de reacción, de esta forma se cumplen los objetivos de la inmovilización de células pero con la ventaja de que no se actúa de forma directa sobre tales células.

El inconveniente de las microcápsulas es su complejo proceso de formación.

A la hora de elegir el método de inmovilización de microorganismos se debe tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Naturaleza de las células
- Condiciones de operación
- Facilidad de preparación
- Regeneración del soporte
- Estabilidad
- Costes

Se ha de tener en cuenta que en este estudio se realizará la fermentación con células libres, y la cinética descrita corresponderá a tales células y no a las inmovilizadas.

ANEXO 5

SUSTRATO

5.1 Medios de fermentación

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un papel esencial en los procesos ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos y además suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

Aunque para cada microorganismo existen unos determinados nutrientes esenciales para el desarrollo de su actividad, estos nutrientes pueden definirse de forma general.

Por un lado se ha de considerar a los macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg, por otro lado están los micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro. También se han de tener en cuenta a los factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a ser empleados como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas.

5.2 Selección del sustrato.

Normalmente se utilizan diversas materias como sustrato, éstas deben de contener los elementos necesarios para conservar la vida de los microorganismos. Estos elementos son los carbohidratos, nitrógeno y sales adecuadas propias para cada tipo de microorganismo. Además se ha de suministrar oxígeno si se quiere aumentar el crecimiento de las células.

Hay diferentes procesos de preparación del sustrato, estos dependen de la materia prima utilizada.

Suelen usarse tres tipos de sustratos, las materias amiláceas, las azucaradas y las celulósicas.

Las materias amiláceas, contienen almidón. En este grupo están las raíces, tubérculos y cereales. Las raíces se muelen, se exprimen y se desecan. El almidón se licua por ebullición a presión y luego se hidroliza enzimáticamente. Como las levaduras no contienen amilasas, lo mismo para las bacterias, el almidón debe ser hidrolizado previamente.

El grano que contiene almidón puede ser arroz, maíz, mijo o patatas. El grano puede ser usado entero o ser triturado.

En el caso del grano de maíz se introduce en agua, empapándose y sometido a una temperatura de 40 a 50°C. Después se tritura y licua.

En las plantas industriales modernas se operan con licuefacción en continuo seguida de una sacarificación. En tales procesos se inyecta primeramente vapor a 150°C durante unos tres minutos, luego se hace un vacío para refrigerar. Durante el proceso se añade alfa amilasas en los siguientes instantes:

- Antes del calentamiento para reducir la viscosidad provocada por el remojo.
- Después del calentamiento y del enfriamiento para la producción de glucosa, además de alfa amilasas también se añaden glucoamilasas.

En las materias azucaradas entran los subproductos de la industria azucarera como las melazas y mieles, además también está el mosto, jugos de diferentes frutas, jugos de caña de azúcar y de la remolacha.

Las melazas son un subproducto de la cristalización del azúcar.

Se obtienen de la remolacha calentando en agua rodajas de la misma.

Cuando la cristalización de las sustancias de la industria azucarera es ya imposible se separan los cristales y el líquido oscuro que fluye con un contenido del 50% de azúcar aproximadamente se denomina melaza.

La composición de las melazas de la caña de azúcar varía de un cultivo a otro ya que depende de la composición del suelo.

Su composición a groso modo se puede indicar en la siguiente tabla:

Tabla 4 Composición de la melaza

COMPUESTO	% V/V
Sacarosa	40-45
Azúcares Reductores	10-15
No azúcar	10-12
Sustancias minerales	7-10
Nitrógeno total	0,3

Para el caso de la caña de azúcar, el jugo se libera usando prensadores. El residuo prensado resultante de los tallos de la caña se llama bagazo. El 80% del bagazo puede ser quemado como fuente de energía en el proceso de destilación y el 20% restante puede ser fermentado después de la hidrólisis química.

El hecho del uso de la caña de azúcar trae grandes consecuencias ya que es una manera de impulsar la industria azucarera, actualmente en crisis.

La materia celulósica como la madera o residuos desechables del procesamiento de la misma son también usados como medio de cultivo.

La madera no ha sido utilizada aún en la producción comercial del etanol pero cada vez está tomando más importancia debido a la gran disponibilidad de residuos celulósicos.

Durante la producción de papel a partir de coníferas se obtiene un líquido sulfítico residual que contiene hexosas fermentables. Si este líquido proviene de árboles caducas no es rentable su uso en el proceso de fermentación ya que contiene una gran cantidad de azúcar en forma de pentosas. Esto no es beneficioso, como se dirá más adelante, porque la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* no es capaz de tomar la fuente de carbono de tales azúcares de cinco carbonos. Tampoco lo es capaz la bacteria *Zymomonas Mobilis*.

En la investigación en laboratorio con microorganismo se usa normalmente productos químicos puros para la obtención de medios de cultivos.

A escala industrial esto no es económicamente rentable, por ello se toman sustratos complejos de alta eficiencia.

El uso de sustratos diversos a los productos químicos deben cumplir las siguientes condiciones:

- Es obligatorio un medio de cultivo óptimamente equilibrado para conseguir la máxima producción.
- La composición de los medios de cultivo debe ser constantemente adaptada al proceso de fermentación.
- En las fermentaciones de prueba en el laboratorio se debe calcular el rendimiento del proceso de producción del etanol y además la separación del mismo.

Como resumen se podría decir que los sustratos utilizables son los que se nombran a continuación:

- Toda materia orgánica rica en sacarosa, como es la caña de azúcar, melaza y sorgo dulce.
- Aquellas que lo sean en almidón como los cereales, maíz, trigo, cebada... y como los tubérculos, yuca, camote, patata, malanga...
- Además también se podrán usar como sustrato las sustancias orgánicas ricas en **celulosa**, como la madera y los residuos agrícolas.

El uso de uno u otro a escala industrial se seleccionará según los siguientes criterios:

- Tipo de materia prima disponible, cantidad anual
- Disponibilidad temporal de la materia prima, una cosecha al año, producción durante todo el año.
- Precio de la materia prima puesta en el lugar de la instalación.
- Precio de la gasolina en el país en donde se desea implantar la fábrica de producción de bioetanol.
- Existencia de exención de impuestos sobre hidrocarburos para la fabricación y comercialización de biocarburantes.

En el caso de nuestro diseño de la planta piloto usaremos el sustrato más económico y el de mayor disponibilidad.

Una vez elegido el sustrato se mezclará con los microorganismos y todo ello se diluirá en agua. También se pueden usar otros **medios de dilución** diferentes al agua pero han de cumplir una característica muy importante, no reaccionar químicamente con el medio de cultivo.

La concentración de sustrato dependerá del carbono suministrado por los azúcares, y éste a su vez depende de la materia prima empleada. La concentración de azúcar afecta a la velocidad de la fermentación, al comportamiento y al desarrollo de las células.

Una concentración óptima de azúcar está en dentro del 10-18%. El valor más empleado es el del 12%.

Si se trabaja con concentraciones muy altas de azúcar, como por ejemplo, sobre el 22% se da una deficiencia respiratoria en los microorganismos y con ello una disminución de la

velocidad de fermentación. Al trabajar con concentraciones muy bajas de azúcares el proceso se hace antieconómico al requerir altos volúmenes para la fermentación.

Para este estudio se ha seleccionado un subproducto de la industria azucarera de la remolacha. Se llama melaza y tiene una gran cantidad de azúcares.

5.3 Melaza

Se denomina melaza al residuo de la fabricación del azúcar. Cuando en la industria azucarera es ya imposible conseguir una mayor cristalización de las masas cocidas por los procedimientos usuales, se separan los cristales de azúcar de un líquido espeso, pardo negruzco. Este líquido aún contiene un 50% de azúcar y es lo que se conoce como la melaza.

La melaza es una de las materias primas más importantes para la fabricación del alcohol.

La melaza puede provenir de la remolacha o de la caña de azúcar.

En Cuba, Puerto Rico,... la melaza proviene de la caña de azúcar. Sin embargo en España, Italia,... la melaza viene de la remolacha, y es la única fuente de producción importante de alcohol industrial.

La melaza de la remolacha, la usada en este estudio, posee una flora bacteriana muy numerosa que puede fácilmente originar fermentaciones butílicas y desnitrificación, ya que el pH óptimo de estas reacciones está alrededor de 6,5.

La melaza se ha de diluir antes de ser usada ya que tiene una concentración de azúcar demasiado alta. Su pH suele rondar los 6,5 y por ello se dan tales reacciones nada interesantes.

La contaminación por microorganismos extraños deja de ser un problema cuando se acidifica la melaza llegando a valores de pH bastantes ácidos, aproximadamente 4,0.

Este pH inhibe por completo la acción de otros microorganismos que no fermenten alcohol.

5.4 Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO₂ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El O₂ es uno de los oxidantes más comunes en el metabolismo energético.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de HPO₄ y SO₄ (o aminoácidos azufrados).

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías, los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I.

En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidos cualitativamente.

A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a aumentos de temperatura por encima de un valor óptimo.

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

El diseño correcto tiene que ver con las características bioquímicas propias y evolución de los parámetros de cada proceso. Por ejemplo, un proceso caracterizado por un descenso continuo de pH, debido al uso de una sal de amonio como fuente de nitrógeno, obliga a considerar en su diseño algún agregado que no corresponda a una exigencia nutricional, como es el caso del control de pH del mismo.

5.5 Esterilización

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

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

La palabra desinfección se aplica a la remoción o destrucción por cualquier vía de organismos vivos que pueden causar daño particular o infección. No significa por lo tanto la destrucción de todos los microorganismos, sino solamente de aquellos que pueden producir un resultado no deseado.

Un antiséptico es un desinfectante, o sea un agente químico usado para destruir microorganismos dañinos. Se utiliza en general para agentes a ser aplicados en animales o humanos.

Asepsia es la exclusión continuada de microorganismos contaminantes. Así por ejemplo el cultivo de microorganismos en el laboratorio es llevado a cabo asépticamente como en muchas fermentaciones industriales. El medio de cultivo es esterilizado para remover toda forma de vida y luego inoculado con el cultivo requerido. Se dice entonces que el sistema se mantiene en condiciones asépticas.

Pasteurización es el término aplicado al proceso que se utiliza para la destrucción de algunos de los microorganismos posiblemente presentes en materiales sensibles al calor como la leche y cerveza. Consiste en calentar la leche, por ejemplo a 62 °C, mantenerla a esta temperatura 30 minutos y después enfriarla lo más rápidamente posible. Esta técnica no es de ninguna manera un procedimiento de esterilización. Es solamente un método para destruir organismos patógenos y al mismo tiempo disminuir el nivel de aquellos organismos que más pueden deteriorar la leche.

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

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

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que hacemos en el laboratorio cuando flameamos un anillo de platino o las bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers. Otra manera de destruir contaminantes es con el uso de poderosos agentes oxidantes. Por supuesto esta metodología, aunque es efectiva, está muy restringida en su empleo.

La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos. El calor húmedo, generalmente en forma de vapor bajo presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización en el laboratorio, que se efectúa en autoclave, o en la industria cuando se esterilizan los medios de cultivo y los equipos de fermentación. En el caso de los autoclaves, se pueden alcanzar presiones de 1 a 3 atmósferas. En escala grande el equipo de producción es esterilizado con vapor saturado bajo presión, y la presión requerida debe ser alcanzada en todas las partes del equipo y el aire debe ser purgado totalmente del sistema (como ocurre también en el caso de los autoclaves) porque la transferencia de calor disminuye mucho en ese caso.

Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos.

La eliminación física está restringida a la esterilización de gases líquidos, y es fundamentalmente llevada a cabo por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

Los filtros absolutos son de materiales cerámicos, de vidrio o de metal sinterizado con poros tan pequeños que la penetración de los microorganismos no es posible.

Los filtros fibrosos no son absolutos y el material filtrante puede ser lana de vidrio, amianto y esteres de celulosa, siendo las fibras de un diámetro variable de 0.5 a 15 micrones.

La cinética de la esterilización por calor húmedo tiene aplicación en la esterilización de medios de fermentación, está caracterizada bastante aproximadamente por una reacción cinética de primer orden.

Si N_0 es el número de organismos viables presentes inicialmente y N es número viable al final se tendrá que la ecuación de velocidad de muerte será:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad \text{Integrando se obtiene} \quad \ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t$$

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

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

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

La ecuación de velocidad de muerte necesita una aclaración, ya que la misma no admite una disminución del número de organismos a cero, porque si N es cero, t debería ser infinito. Para resolver este problema supongamos que $N = 0.1$ y calculemos el valor correspondiente de t . No podemos decir que después de ese tiempo sobrevivirá una décima parte de un

microorganismo, pero si podemos decir que habrá sólo una probabilidad de 1 en 10 de que sobreviva un microorganismo.

Ya veremos que por razones de seguridad podemos fijar el valor de $N = 0.001$ o sea fijar una probabilidad de 1 en 1000 de sobrevivencia.

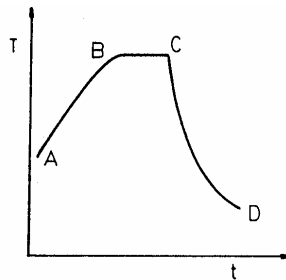


Fig.29 Variación de la temperatura en función del tiempo en un proceso de esterilización en Batch.

La figura 29 muestra una curva típica de la esterilización en batch de un medio en un fermentador. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporos es 100 °C. Por lo tanto tendremos eliminación de esporos de 100 a 120 °C durante la etapa de calentamiento y de 120 a 100 °C durante la correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo. En fermentadores industriales de 60.000 l por ejemplo esos tiempos están en el orden de 28-30 min. y 11-14 min. para los períodos de calentamiento y enfriamiento respectivamente.

En la práctica de la esterilización es necesario tener presente que la calidad nutriente del medio debe ser preservada todo lo posible, razón por la cual, es imprescindible diseñar un ciclo de esterilización lo más efectivo posible pero al mismo tiempo lo más corto posible.

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

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t \quad \text{Y por tanto se cumpliría } \nabla = A \cdot t \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

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

$$\nabla_{Total} = \nabla_{Calentamiento} + \nabla_{mantenimiento} + \nabla_{enfriamiento}$$

El calentamiento y el enfriamiento transcurren a temperaturas variables, así que es necesario integrar la ecuación para tales periodos. Así se puede determinar la cantidad de esporas que se han eliminado en ese transcurso de tiempo. Se debe conocer el volumen inicial de esporas y se ha de llegar a 120°C.

$$k dt = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} dt$$

Existen datos, en bibliografía, de cálculo de tiempo de mantenimiento para la esterilización de 45,000 l de medio (con un valor de $N_0 = 2 \times 10^7$ esp/ml) que demuestra que son necesarios solamente 8,8 min como tiempo de mantenimiento a 120 °C.

Debe tenerse en cuenta que estas consideraciones son válidas para el cálculo del tiempo de esterilización mínimo, a 120 °C, en fermentadores industriales del volumen considerado. En el caso del laboratorio cuando utilizamos un autoclave y deseamos esterilizar distintos recipientes con volúmenes diversos de medio, el tiempo de calentamiento y de enfriamiento no son generalmente considerados, salvo en el caso de equipos que tengan un período de calentamiento y de enfriamiento prolongado, los que por otra parte no son recomendados para su uso en el laboratorio. Lo que es importante en este caso es el tipo de recipiente, su geometría y el volumen de medio a esterilizar.

El tiempo de esterilización (o sea el tiempo de mantenimiento a 120 °C) requerido por ejemplo para tubos de ensayo de 18 x 50 mm es de 12-14 min y para tubos de 38 x 200 mm, de 15-20 min. Erlenmeyers de 2000 ml requieren de 30-35 min mientras que si son de 125 ml el tiempo es de 12-14 min. En cambio un frasco pyrex cuadrado de 1000 ml requiere 30-35 min y una botella de suero de 9000 ml 50-55 min. Estos tiempos aseguran la eliminación de esporos bacterianos de las especies más resistentes.

ANEXO 6

CINÉTICA

6.1 Introducción

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para fabricar nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota, este sería el sustrato limitante. Consecuentemente el crecimiento se detiene. También puede detenerse el crecimiento por acumulación de alguna sustancia inhibidora formada por las mismas células como puede ser una alta concentración de alcohol. Si se supone que en este caso se detiene el crecimiento a causa del agotamiento del sustrato limitante, se puede considerar dos aspectos fundamentales que definen al crecimiento microbiano. Estos aspectos serían, por un lado el estequiométrico, ya que la concentración final de microorganismos obtenidos dependerá de la concentración y composición del medio de cultivo, y por la otra parte el de tipo cinético, el que dirá con qué velocidad se lleva a cabo el proceso.

6.2 Crecimiento celular

Antes del inicio de la fermentación, el medio de cultivo contiene una gran cantidad y variedad de microorganismos como mohos, bacterias, levaduras, esporas e incluso protozoos. Sin embargo, son las levaduras y bacterias las que empiezan a sobrevivir y multiplicarse en este medio, aún cuando las bacterias permanecen durante gran parte del proceso en estado latente. Inicialmente el mosto es un medio adecuado para el crecimiento y poco a poco se va volviendo inhóspito debido a la disminución de azúcares y nutrientes y al incremento de la concentración de alcohol.

Cuando el medio es favorable, las levaduras se multiplican por vía vegetativa asexual durante la mitosis, mientras que al final de la fermentación alcohólica, comienzan a reproducirse sexualmente por meiosis, señal de que el medio de vida es muy desfavorable como consecuencia de la falta de nutrientes.

En el metabolismo celular, no todo el sustrato es consumido para la formación de nueva biomasa, sino que parte se emplea para el mantenimiento celular, otra para la producción de producto y otra parte se dirige al desarrollo celular. Por esto, surge el concepto de rendimiento global estequiométrico (teórico) y el aparente.

El rendimiento estequiométrico se define como la cantidad de biomasa o producto formado por la cantidad de sustrato consumido con esa finalidad. El rendimiento estequiométrico sería la cantidad de biomasa o producto presente entre la cantidad total de sustrato consumido.

El rendimiento teórico es difícil de hallar ya que el proceso es complejo y no se puede averiguar qué cantidad de sustrato va dirigido a la formación de nuevas células y a sus funciones vitales.

El crecimiento celular consta de cuatro fases, la primera se refiere a la fase de latencia, donde las células permanecen inactivas. La segunda fase es la de crecimiento exponencial, el medio rico en nutrientes propicia tal desarrollo hasta llegar hasta la tercera fase. Esta es la fase estacionaria, en ella el número de células que crecen nuevas es igual al número de células que

perecen. La última fase corresponde con un medio hostil donde se carece de alimento para el desarrollo de la biomasa y se llega a la muerte de tales organismos.

Para el caso del microorganismo escogido y el proceso a desarrollar, estas fases se dan entre 72 horas y 96 horas. Ya que también hay que contar que la muerte de tales microorganismos no sólo se debe a la escasez de nutrientes sino a la elevada concentración de alcohol.

En la siguiente gráfica se puede apreciar tales fases, en discontinuo.

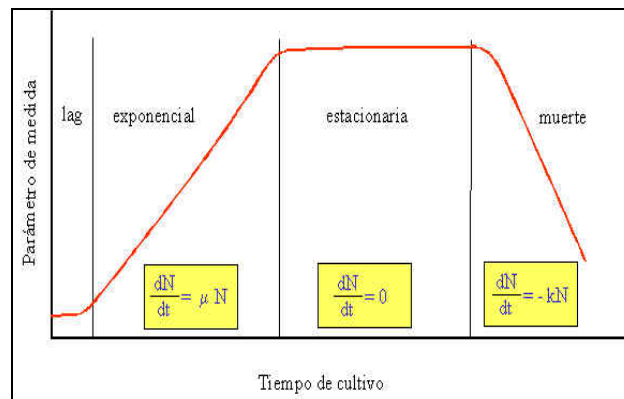
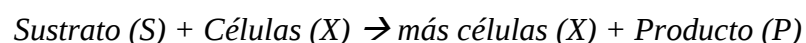


Fig.30 Fases del crecimiento celular.

6.3 Cinética del crecimiento celular

A pesar de que el crecimiento de las células es un fenómeno muy complejo, a menudo se puede obtener una descripción global buena del mismo a través de ecuaciones relativamente sencilla. Entre ellas la más usada es la ecuación de Monod. Esta ecuación describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante y se puede expresar de la siguiente manera:



$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

Donde r_x es la velocidad de crecimiento de la células, μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento y K_s es la constante de Monod.

Es bastante común expresar la ecuación en función de la velocidad específica de crecimiento:

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

En la cual μ_m es el máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento cuando $S \gg K_s$ y las concentraciones del resto de nutrientes no han cambiado de forma considerable.

K_s es el valor de la concentración del nutriente limitante a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima. Para valores de S inferiores a K_s , la velocidad de crecimiento depende de una forma lineal de S , mientras que para valores superiores, el valor de μ se hace independiente de S .

Uno de los inconvenientes que plantea el uso de la ecuación de Monod es la correcta determinación del valor de K_s , ya que este es normalmente muy pequeño y no es fácil de averiguar.

La ecuación de Monod es muy simple y no siempre permite obtener una buena representación de los datos de crecimiento de un microorganismo. Por ello se han desarrollado otros modelos más complejos basados en este.

El modelo de Monod describe sólo a los periodos de crecimiento exponencial y a la fase estacionaria.

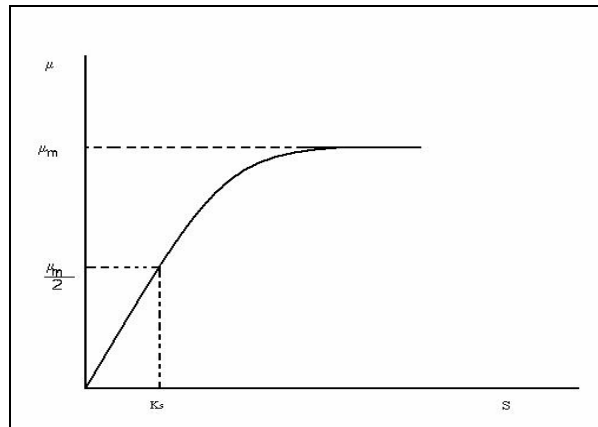


Fig.31 Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según la ecuación de Monod.

En términos más complejos se puede usar la ecuación logística, es un modelo sencillo donde se considera que la velocidad de crecimiento de las células sólo depende de la concentración de las células pero incluye además un término de inhibición proporcional al cuadrado de la concentración de biomasa.

$$\frac{dX}{dt} = kX - \beta X^2$$

Donde k es un término análogo al de la ecuación de Malthus y β es una constante del término de inhibición.

6.4 Rendimientos

Como se dijo anteriormente los rendimientos se definen como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, usualmente referidos a la fuente de carbono y energía. El rendimiento celular se define a través del concepto de nutriente limitante.

Un nutriente limitante es aquel sustrato que cuyo consumo controla la velocidad de producción de biomasa. Es decir que la velocidad de crecimiento celular es función de tal nutriente. En muchos casos existen más de un nutriente u otros factores que intervienen en dicha velocidad, pero para simplificar se considera siempre que sólo uno es el esencial y el más importante.

A través de este concepto de sustrato limitante se puede definir el rendimiento del proceso.

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa Pr oducida}}{\text{ConsumoSustrato}} = \frac{gX \text{ sec } a}{gS\text{consumido}} \quad [3]$$

El sustrato normalmente es la fuente de carbono. El rendimiento está en función de tal fuente de Carbono usada y las condiciones del proceso. Puede variar durante el proceso.

El consumo de sustrato no está dedicado sólo a la producción de biomasa.

Éste tiene tres cometidos, para asimilación de los microorganismos como material celular, provisión de energía para la síntesis celular y energía para el mantenimiento del cultivo.

Entonces la siguiente ecuación representa el consumo total del sustrato:

$$\Delta S = (\Delta S)_{MC} + (\Delta S)_C + (\Delta S)_M \quad [4]$$

Sustrato total = Sustrato empleado asimilación materia celular + Provisión Energía síntesis celular + Energía mantenimiento cultivo

Con la ayuda de la ecuación 3 y la 4 se tiene:

$$\frac{\Delta S}{\Delta X} = \frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} = \frac{(\Delta S)_{MC}}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_C}{(\Delta X)} + \frac{(\Delta S)_M}{(\Delta X)}$$

El rendimiento teórico se define como $\Delta X / (\Delta S)_{MC}$ que es el sustrato empleado en la asimilación de los microorganismos como material celular. También se llama el rendimiento del crecimiento. Este rendimiento permanece constante si la composición celular se mantiene constante.

Sin embargo el rendimiento global dependerá de la fracción de sustrato consumido en cada una de las actividades celulares.

El rendimiento definido mediante la ecuación 1 se refiere al rendimiento celular, existen otros rendimientos referidos a otros parámetros del proceso o en función de otras variables. Estos pueden ser como los que siguen a continuación:

$$Y_{\frac{x}{o}} = \frac{\Delta X}{\Delta O} = \frac{\text{Biomasa Pr oducida}}{\text{ConsumoOxígeno}} = \frac{gX \text{ sec } a}{g\text{OxígenoConsumido}} = \frac{gX \text{ sec } a}{\text{molOxígenoConsumido}}$$

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Pr oducto Pr oducido}}{\text{ConsumoSustrato}} = \frac{g / \text{molP}}{g / \text{molSconsumido}} \quad (\text{Rendimiento del producto})$$

$$Y_{\frac{c}{s}} = \frac{\Delta C}{\Delta S} = \frac{\text{CO}_2 \text{ Pr oducido}}{\text{ConsumoSustrato}} = \frac{\text{MolCO}_2 \text{ Pr oducido}}{\text{MolSConsumido}}$$

$$\text{TasaCrecimientoMolar} = \frac{gX \text{ sec } a}{\text{MolSconsumido}}$$

Con todo esto se puede escribir la siguiente ecuación:

$$r_s = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}}\right)r_x = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{P}{S}}}\right)r_p = -\left(\frac{1}{Y_{\frac{C}{S}}}\right)r_c$$

Donde r_s (mol S/m³s) es la velocidad de desaparición de sustrato, r_x (mol X/m³s) es la velocidad de aparición de biomasa, r_p (mol P/m³s) es la velocidad de aparición de producto y r_c (mol CO₂/m³s) es la velocidad de aparición de CO₂.

Otra manera de definir el rendimiento es a través del calor o la energía de reacción generada por el consumo de sustrato. La generación de calor es el resultado del metabolismo energético y de crecimiento, por ello existe una relación entre el calor producido y la energía utilizada del sustrato.

Se introduce un nuevo factor de rendimiento, Y_Δ (gramos de biomasa/calorías generada)

$$Y_\Delta = \frac{Y_{\frac{X}{S}}}{\Delta H_s - Y_{\frac{X}{S}} \Delta H_c}$$

Donde ΔH_s y ΔH_c son las entalpías de combustión del sustrato y del material celular respectivamente.

Esta ecuación representa un balance aproximado de energía para un crecimiento aerobio. Los valores de Y_Δ dependen de la especie celular concreta y del tipo de sustrato consumido.

En la siguiente tabla se pueden ver algunos rendimientos celulares sobre la melaza como fuentes de carbono.

Tabla 4. Rendimientos característicos de la melaza

Sustrato	$Y_{X/S}$	$Y_{X/O}$	Y_Δ
Glucosa, melaza, almidón	0,51	1,47	0,42

En definitiva, los rendimientos que se aplicarán en este proceso en cuestión serán los referidos al crecimiento celular y el producto obtenido, todo ello respecto del consumo de sustrato. Es decir, que a través de tales rendimientos se obtendrá el aprovechamiento de los nutrientes para la obtención de etanol.

6.5 Cinética del consumo de sustrato

El sustrato consumido por el microorganismo tiene como finalidad el crecimiento celular, mantenimiento de las actividades vitales y la generación de producto, para el caso donde la formación de producto no esté asociada de forma directa al metabolismo energético.

Para modelar la variación de la concentración del sustrato con el tiempo se proponen diversas ecuaciones.

La primera es la más utilizada pero no es siempre aplicable. Por ello aparecen las demás ecuaciones.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} \rightarrow \text{Sin formación de producto y sin mantenimiento}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - m_x X \rightarrow \text{Sin formación de producto}$$

$$\frac{dS}{dt} = -m_x X \rightarrow \text{Sin formación de biomasa ni de producto}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{\frac{p}{x}}} \frac{dP}{dt} \rightarrow \text{Sin mantenimiento celular}$$

La ecuación cinética global será:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{\frac{p}{x}}} \frac{dP}{dt} - m_s X$$

6.6 Cinética de formación de producto

De manera análoga al modelo cinético de consumo de sustrato se plantean diferentes ecuaciones para modelar la formación de producto.

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

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

Y mediante el uso de las dos ecuaciones anteriores se obtiene el modelo de Luediking-Piret, parcialmente asociado al crecimiento.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

La evolución del producto, del sustrato y de la biomasa conforme transcurre el tiempo dentro del proceso la muestra la siguiente gráfica.

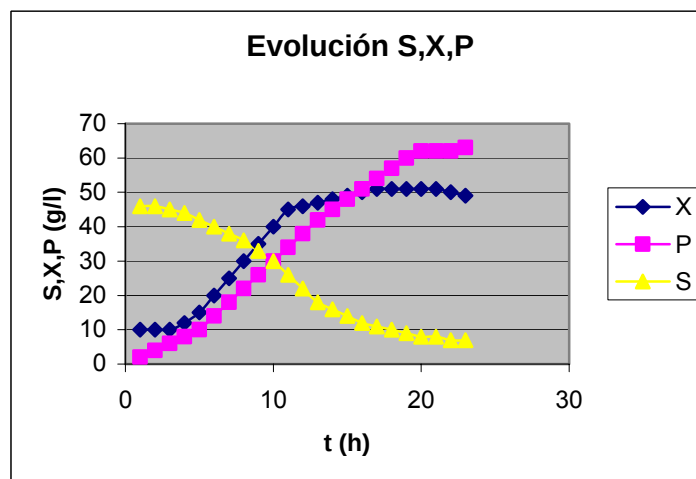


Fig.32 Evolución del sustrato, de la biomasa y del producto respecto el tiempo

ANEXO 7

BIORREACTORES

7.1 Aspectos básicos de los biorreactores

El equipo donde se realiza el proceso se denomina biorreactor o fermentador.

El mismo provee todos los servicios que son necesarios para el cultivo, tales como mezclado, termostatación, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control del pH, etc. Por otra parte, cuando se habla de sistemas de cultivo o, también, métodos de cultivo, se hace referencia al modo de operar del biorreactor, esto es en forma continua, discontinua o semicontinua.

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

$$\text{Velocidad de Acumulación} = \text{Velocidad de Ingreso} - \text{Velocidad de Salida} + \text{Velocidad de Formación} - \text{Velocidad de Consumo}$$

Según sea el modo de operación, es decir, continuo, discontinuo o semi-continuo, se tendrán unos términos de la ecuación u otros, así se plantearán los balances del proceso.

7.2 Selección del biorreactor

La utilización de células libres o inmovilizadas en transformaciones químicas es un área de gran interés industrial por sus enormes posibilidades industriales.

Es frecuente el uso de columnas de relleno, reactores continuos provistos de sistemas de agitación, de lecho fijo y también reactores de lecho fluidizado.

Los criterios tomados para la selección y forma de operación son los siguientes:

- Dificultad de retener a los microorganismos en el interior del reactor.
- Dificultad de reutilización de las células usadas.
- Dificultad en mantener la actividad de los microorganismos durante largos periodos de operación.
- Formación de espumas
- Control del proceso global mediante los fenómenos de transferencia.
- Efectos electrostáticos.
- Obturación del sistema con la consiguiente dificultad en el mantenimiento del flujo de reactantes.

En el diseño del reactor se deben de tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Selección del mejor tipo de reactor para obtener una cantidad determinada de producto deseado.
- Determinar el tamaño óptimo del reactor o del sistema de reacción.

- Establecimiento del mejor método de operación: fijar las variables de operación (presión, temperatura, pH, composición de la alimentación, caudales...) del reactor.

En el caso ha estudio el diseño del reactor no se basaría en escoger un tipo y un tamaño determinado ya que el reactor ya existe, sin embargo sí se podrán diseñar las condiciones de operación y formas de trabajar. Se fijarán los parámetros como la temperatura, pH, concentración de la corriente de alimentación, el modo de operar, en continuo, semicontinuo o discontinuo. Además de fijar los caudales y el suministro de oxígeno.

Se debe de tener en cuenta la existencia de reactores biológicos de alta tecnología que harían aumentar el rendimiento y disminuir los costes de forma muy importante. Al usar un reactor sencillo y si además se opera en discontinuo la eficiencia global del sistema es bastante menor que si se usan reactores de procesos avanzados.

Pero también la inversión es menor como la complejidad en los procesos convencionales. Sólo decir que en este estudio se comparará el modo de operar en continuo, semicontinuo y en discontinuo usando un mismo reactor, de tanque agitado.

Los datos necesarios para el diseño del reactor son los siguientes:

- Termodinámica de la reacción.
- Cinética del proceso en las condiciones experimentales que pueden ser de interés.
- Datos físicos-químicos de las sustancias que intervienen en el sistema para el intervalo de condiciones en que se espera operar.
- Producción necesaria.

También se ha de tener en cuenta la posibilidad de corrosión existente, aquí entra el material de construcción del reactor.

Los datos cinéticos que normalmente provienen de un estudio realizado a escala de laboratorio, que indicarán con bastante exactitud el efecto de las variables sobre la velocidad de la reacción, no dan información sobre ciertos problemas a resolver a escala industrial, como por ejemplo los fenómenos de transferencia de materia, variación en la concentración de las impurezas en el reciclado, distribución real de la temperatura dentro del reactor y un largo etc que no son más que todas las variables que de una forma u otra influyen en el sistema de reacción.

Por este motivo es necesario contar con la información obtenida de una planta piloto que servirá para demostrar o verificar la ecuación cinética desarrollada a escala de laboratorio.

7.3 Objetivos y diseño de un fermentador

Los objetivos que se marcan en la fermentación están relacionados con la optimización de la producción de un producto específico generando el menor gasto energético posible. A continuación se presentan de forma más precisa tales metas.

- Obtener alto rendimiento en el producto deseado. Es decir, conseguir la máxima conversión de la materia prima y una alta selectividad para evitar el desarrollo de reacciones secundarias sin interés industrial.

- Alcanzar alta productividad global que es función de la velocidad a la que transcurre el proceso.
- Obtener la máxima concentración de producto y así disminuir los costes de separación.

Se han de tener en cuenta una serie de factores a la hora de diseñar el reactor.

Existen grandes avances en las técnicas de fermentación. Los procesos convencionales en la producción de etanol son de menor eficacia que los procesos altamente tecnológicos. Pero estos últimos también son más costosos.

La eficacia de los procesos de fermentación generalmente está limitada por causas como una baja productividad debido a una operación discontinua, o problemas de inhibición por sustrato o producto. También se ve restringida por una baja concentración celular. Y las limitaciones por transferencia de materia condicionan de manera considerable la eficacia global, sobretodo si se usan biocatalizadores inmovilizados.

Cuando se plantea el problema de la elección del reactor se debe estudiar cuál de estos parámetros influye más en el proceso.

Por ello dependiendo de qué factor hace aumentar más el rendimiento del proceso convendrá operar con un tipo de reactor u otro, sea de mezcla perfecta, flujo pistón, o estableciendo un modo de operar, continuo, discontinuo, con recirculación...

Para mantener la concentración de sustrato por debajo del nivel en que se da la inhibición y al mismo tiempo conseguir la concentración óptima de sustrato para que se dé un proceso efectivo conviene el uso de reactores de mezcla completa.

Cuando se requiere minimizar los efectos provocados por la inhibición causada por el producto se plantean dos estrategias diferentes: eliminación del producto obtenido a medida que se está formando; o sino conseguir una configuración del sistema de reacción en cuyo modelo de flujo tenga un comportamiento próximo al de flujo en pistón.

Cuando lo que se desea es aumentar la concentración celular en el reactor se acude a los mecanismos anteriormente descritos, es decir a la inmovilización de las células. Además de esta manera de aumentar la concentración de biomasa se puede recurrir a la recirculación celular.

En la práctica se suele recurrir de forma más habitual a la recirculación.

Cuando existen limitaciones por transferencia de materia pueden darse dos casos, uno se referiría al aporte de sustrato en sistemas inmovilizados y la difusión del oxígeno. Otro sólo comprendería la mejora de la transferencia del oxígeno. En este caso sólo se tendrá en cuenta fenómenos de transferencia de oxígeno. Y esta transferencia, como ya se explicará más adelante, aumenta con el uso de un buen sistema de dispersión de gas (boquillas, difusores...) haciendo aumentar el área interfacial o sino a través de las modificaciones precisas en el sistema de agitación, es decir, modelando la potencia a aportar para un buen contacto entre las células y el oxígeno disuelto.

En el caso expuesto en este proyecto las células no quedarán fijas, es decir que serán libres en el movimiento, las limitaciones por transferencia de sustrato serán despreciables ya que microorganismos y nutrientes se mezclarán homogéneamente gracias a un sistema de agitación. Además la difusión de oxígeno mejorará.

El problema reside en la reutilización de la biomasa, para ello, se recirculará la materia celular así se aumentará la concentración de la misma.

Existirá un aporte de oxígeno exterior a través de un difusor y con compresor.

7.4 Análisis de costes

Los costes más importantes en un proceso de fermentación son la materias primas, los costes de capital (procesos de producción y separación) y los servicios y suministros (electricidad, agua,...)

El aprovisionamiento y la preparación del sustrato están en función de la materia prima escogida para la producción del mismo producto. En el caso del etanol, el uso de almidón de maíz genera un coste del 54% sobre los costes totales respecto al 42% que genera la caña de azúcar cuando se usa para la producción del etanol.

La reducción del precio de la materia prima o una mejora en el aprovechamiento de ésta conlleva a una reducción de los costes globales del proceso.

Las unidades de fermentación influyen de forma decisiva en los costes globales ya que el proceso de destilación presenta los costes más altos.

Se ha de tener en cuenta que el desarrollo tecnológico promueve el aumento de la producción y para ello se construyen equipos que permiten aumentar la concentración celular.

Las técnicas utilizadas son la inmovilización, floculación, uso de reactores de membranas... Todo esto se refiere a la estrategia de la reutilización de la materia prima.

También se aumenta la producción mediante un modo de operar eficaz, como el continuo o el Fed-Bach, es decir, el semicontinuo. Estos aspectos entran en la estrategia de la alimentación.

Los microorganismos toman el carbono y la energía necesaria del medio acuoso en donde habitan. Pero a medida que avanza el proceso este medio se hace más hostil ya que la concentración de etanol aumenta y tiene efectos altamente inhibidores en la actividad de tales células. Por ello es necesaria la instalación de equipos de separación de alta eficacia. Lo cual conlleva a un aumento de costes de capital.

Los costes referidos al suministro de energía o gasto de agua de la red son los soportados en operaciones de agitación y de calefacción del reactor. También el vapor de agua es considerado un coste ya que su generación se hace a través de calentamiento mediante aporte de electricidad y el gasto de agua.

Estos costes son los relativos a la agitación, calefacción y esterilización. Además de los sistemas de bombeo de agua y aire.

La recuperación del producto también representa un elevado coste de operación, sobretudo si se usa la destilación.

Por ello se está comenzando a usar otras técnicas más económicas como la ultrafiltración, la ósmosis inversa, la adsorción o la extracción. Estos métodos de separación se desarrollarán más adelante.

7.5 Balances de materia y energía

En el diseño y análisis de un reactor biológico es necesario conocer la cinética del proceso y el balance de materia y energía aplicado al sistema. Además hay que contar con la variación

de las propiedades de la biomasa según avanza el proceso, ya que se distinguen diversas fases según la concentración de sustrato, oxígeno y producto.

Para el desarrollo de un modelo dinámico del sistema se recurren las ecuaciones de la conservación de la masa y de la energía.

Balance de materia

$$(Acumulación) = (Generación Por Reacción) + (Flujo Entrada) - (Flujo Salida)$$

Esta ecuación se aplica para cada componente del sistema, es decir, para los microorganismos, para el sustrato y para el etanol.

Las limitaciones por transferencia se considerarán en principio despreciables y que estas sólo tomarán valor cuando se trate de procesos entre diferentes fases.

La ecuación puede tomar la siguiente forma:

$$\frac{d(C_i \cdot V)}{dt} = V \cdot r_i + (Q_e \cdot C_{ie} - Q_s \cdot C_{is})$$

El primer término de la ecuación indica la variación de la concentración de un componente *i* respecto del tiempo. Este término representa la acumulación.

El segundo término se refiere a la generación del componente *i* debido a la reacción bioquímica del sistema. El tercero es la aportación del componente *i* a través del flujo neto convectivo de materia, es decir, la diferencia entre la entrada y la salida.

Esta ecuación se simplifica según los modelos de reactor al cual se refiere.

Balance de energía

$$\frac{d(V \cdot \bar{\rho} \cdot T \cdot C_p)}{dt} = (-\Delta H) \cdot V \cdot r_i + Q \cdot \bar{\rho} \cdot C_p \cdot (T_s - T_e) + q$$

Donde el primer término se refiere a la acumulación de energía en el sistema, el segundo es el que indica la generación de energía por reacción bioquímica y el tercero a la diferencia de entalpía entre la entrada y la salida del sistema. El cuarto es el caudal de calor suministrado o retirado del sistema desde fuera.

En los procesos de fermentación la transferencia de calor es sencilla y no presenta complicación alguna.

Las reacciones biológicas que se dan no generan mucho calor.

Debe de existir un dispositivo de intercambio de calor para elevar así la temperatura de operación y llegar a la óptima. Estos equipos suelen ser sencillos. El diseño de éstos se desarrollará en un apartado posterior.

Las ecuaciones de balance de materia y energía se darán para los distintos componentes del sistema.

7.6 Reactores de tanque agitado

Los reactores de tanque agitado son un tipo de reactores donde se consigue homogenizar la mezcla contenida en él, haciendo que todas las variables, concentración, temperatura, pH, presión... sean iguales para cualquier punto del medio contenido en el tanque. La concentración final, o de salida debe ser igual a la concentración de la mezcla de dentro del reactor.

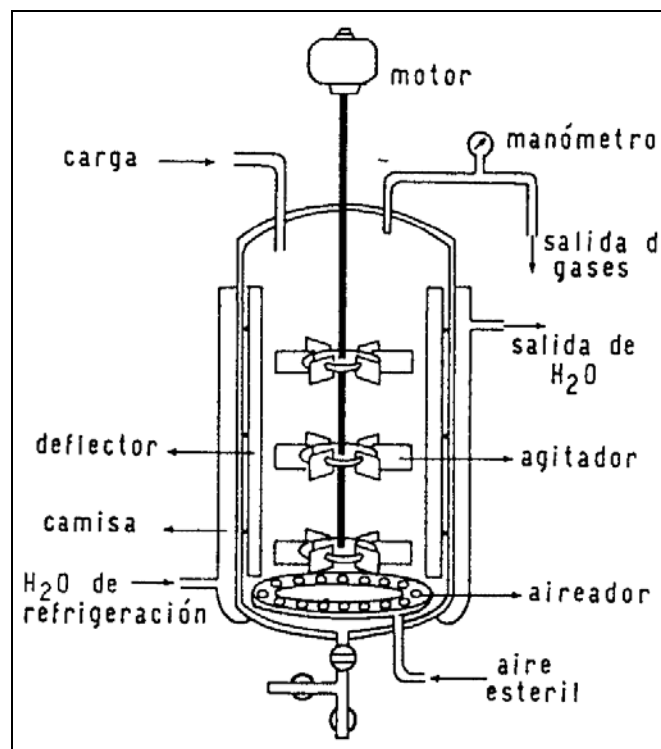


Fig. 33 Reactor de mezcla perfecta

En la figura 33 se puede ver el funcionamiento del tanque agitado.

El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente.

El chorro de aire que sale de cada orificio es golpeado por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el O_2 hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro o seis deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado. El tanque está rodeado por una camisa por la que circula agua, lo que permite controlar la temperatura. Para tanques mayores que 1000 ó 2000 litros este sistema ya no es eficiente y es reemplazado por un serpentín que circula adyacente a la pared interior del tanque. Debe tenerse en cuenta que a medida que es mayor el volumen de cultivo también lo es la cantidad de calor generado por lo que se hace necesario una mayor área de refrigeración. Los tanques son de acero inoxidable y están pulidos a fin de facilitar la limpieza y posterior esterilización. El aire que ingresa al

bioreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por un filtro cuyo diámetro de poro es de 0,45 micrones, que impide el paso de microorganismos y esporos. Es el tipo de reactor más empleado a escala industrial y será el que se utilice para la producción del etanol.

Se puede operar de tres formas: de forma discontinua, discontinuo alimentado (fed-Bach) y de forma continua.

Las dos primeras maneras de operar dan procesos no estacionarios de periodos cortos.

La operación en continuo trabaja en estado estacionario exceptuando los periodos de arranque y parada del reactor, en algunas desestabilizaciones que puedan darse.

7.7 Sistemas de cultivo en discontinuo (*Batch*)

El más tradicional y más usado es el reactor discontinuo. Se emplea usualmente en la industria farmacéutica, alimentaria y biotecnológica.

Al ser el tiempo de operación corto en relación con el continuo, se puede asegurar de forma fácil las condiciones asépticas durante todo el proceso de reacción.

Las principales desventajas son: la pérdida de rendimiento debido a los periodos de arranque y parada, la falta de homogeneidad del producto obtenido en cargas consecutivas y la dificultad de implementación de esquemas de integración energética.

Estos tipos de reactores operan con una baja concentración celular, sobretudo en el instante inicial donde los microorganismos permanecen en fase latente. Y por este motivo se ha de controlar la concentración de nutrientes en el sustrato ya que sino se podía ralentizar el proceso de fermentación.

Además el proceso global es más lento que si se operase de forma continua ya que al no haber retirada de producto ni aporte de nutrientes, en los instantes finales del proceso las condiciones del medio son hostiles, alta concentración de etanol y baja concentración de nutrientes. Al darse fenómenos de inhibición la fermentación tarde en completarse.

En un reactor biológico discontinuo el caldo de nutrientes y la cepa se introducen conjuntamente en el instante inicial. A partir de ese momento no existen corrientes de entrada ni salida del reactor. Sólo habrá entrada y salida de gases (oxígeno, dióxido de carbono) y se añadirá antiespumantes y reguladores del pH.

El reactor se mezclará de forma completa siendo así la concentración de cada componente en un determinado tiempo es constante con la posición dentro del reactor. Al finalizar el proceso, cuando se ha llegado a una conversión fijada, la concentración a la salida de cada componente será la misma en el interior del reactor.

El balance de materia se ve modificado ya que los términos de entrada y salida se anulan.

$$(Acumulación) = (Generación Por Reacción)$$

La ecuación de balance para el crecimiento microbiano será:

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = V \cdot r_x$$

Como el volumen del reactor es constante, integrando la ecuación se haya el tiempo necesario para lograr un determinado crecimiento celular.

$$t = \int_{X_e}^X \frac{dX}{r_X}$$

Cuando el balance se aplica al sustrato y el volumen permanece constante se tiene el siguiente tiempo de fermentación para obtener una determinada conversión:

$$t = - \int_{S_e}^S \frac{dS}{r_{SX} + r_{SP}}$$

La velocidad de consumo de sustrato depende de la velocidad de crecimiento de biomasa y de la velocidad de producción del etanol. Es decir, el sustrato se empleará para producir más microorganismos y además para la obtención del producto.

La ecuación tiene signo negativo para indicar que el sustrato desaparece con el tiempo.

Aplicando el balance para el producto se tiene la siguiente ecuación que representa el tiempo de operación necesario para producir una cantidad determinada de producto.

$$t = \int_{P_e}^P \frac{dP}{r_P}$$

Si se supone una cinética tipo Monod las ecuaciones anteriores quedan de la siguiente forma:

$$r_X = \mu \cdot X = \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{K_S + S}$$

Sabiendo que $Y_{\frac{X}{S}} = \frac{dX}{dS}$ y multiplicando su inversa a ambos lados de la ecuación anterior, se tiene:

$$r_S = - \frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}} \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{K_S + S} \text{ ec.}^*$$

Asumiendo que el rendimiento de sustrato en biomasa permanece constante en la zona de aplicación se tiene:

$$X_e + Y_{\frac{X}{S}} \cdot S_e = X + Y_{\frac{X}{S}} \cdot S$$

Esta ecuación permite evaluar el crecimiento de biomasa en función al consumo de sustrato.

Si se expresa X en función de S y se integra la ecuación * se obtiene el tiempo de fermentación necesario para reducir la concentración de sustrato a un determinado valor, fijado por el diseñador.

$$(X_e + Y_{\frac{X}{S}} \cdot (S_e + K_S)) \cdot \ln\left(\frac{X_e + Y_{\frac{X}{S}} (S_e - S)}{X_e}\right) - K_S \cdot Y_{\frac{X}{S}} \cdot \ln \frac{S}{S_e} = \mu_m \cdot (X_e + Y_{\frac{X}{S}} \cdot S_e) \cdot t$$

Se ha de tener en cuenta que no todas las células se encuentran en la misma fase de su crecimiento. Si se considera que sólo las células viables (X_v) generan otras células muertas (X_d) según una cinética de primer orden, se tiene:

$$\frac{dX_d}{dt} = k_d X_v$$

La concentración de células viables viene dada por la ecuación:

$$\frac{dX_v}{dt} = \mu \cdot X_v - k_d \cdot X_v$$

Y el crecimiento de la población celular se podrá expresar así:

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu \cdot X_v = \frac{d(X_v + X_d)}{dt}$$

En la etapa exponencial del crecimiento la velocidad específica es constante, entonces la concentración de células viables se podrá calcular para todo instante de tiempo, dentro de tal periodo exponencial, a través de la siguiente igualdad:

$$X_v = X_{v0} \cdot e^{(\mu_m - K_d \cdot t)}$$

7.8 Sistemas de cultivo en discontinuo alimentado (*fed-batch*)

En los reactores semi-continuos el sustrato es alimentado en cargas sucesivas y el producto no se retira hasta finalizar el proceso. Esto indica que el volumen del medio de reacción va variando conforme avanza el proceso.

Esta manera de operar hace posible el control de la concentración de nutrientes en el medio, y así se da una mejora en el rendimiento respecto al modo de operar del reactor discontinuo.

La variación de la adición de sustrato puede estar condicionada por una estrategia que haga aumentar la producción del etanol o tomando como criterio la medida de diferentes variables como la concentración de producto, sustrato, el pH, el oxígeno disuelto...

El control de la concentración de sustrato, siendo éste limitante, resulta de interés para los casos en que se quiere controlar el crecimiento celular o para la obtención de producto dependiente de una determinada concentración de sustrato.

Se suele usar para la producción de levaduras de pan y antibióticos.

El sustrato se va añadiendo a medida que se va consumiendo y se mantiene su concentración en valores que permitan alcanzar velocidades de reacción aceptables, buscando un equilibrio entre el aumento de velocidad por incremento de concentración de nutrientes y disminución causada por la inhibición del etanol.

La adición del sustrato puede efectuarse en forma cíclica o en continuo.

Balance de materia resultante:

$$\frac{d(C_i \cdot V)}{dt} = V \cdot r_i + Q_e \cdot C_{ie}$$

Si se considera que la densidad del fluido en el reactor y en la corriente de entrada son iguales, esto ocurre así cuando la densidad celular no es muy elevada, se puede decir que en sistemas con alimentación continua el caudal alimentado es igual a la variación de volumen con el tiempo, y se puede expresar de la siguiente forma:

$$\frac{dV}{dt} = Q_e$$

$$V \cdot \frac{dC_i}{dt} + C_i \frac{dV}{dt} = V \cdot r_i + Q_e \cdot C_{ie}$$

$$V \cdot \frac{dC_i}{dt} + C_i \cdot Q_e = V \cdot r_i + Q_e \cdot C_{ie}$$

$$\frac{dC_i}{dt} = r_i + \frac{Q_e}{V} \cdot (C_{ie} - C_i)$$

Aplicando la ecuación para la biomasa se tiene:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{Q_e}{V} \cdot X$$

Y para el sustrato:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{Q_e}{V} (S_e - S) - \frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}} \cdot \mu \cdot X$$

7.9 Reactor continuo de tanque agitado

En general los reactores continuos de tanque agitado son equipos cilíndricos con un sistema mecánico de homogenización, como la agitación donde se garantiza que la composición es la misma en cualquier punto del reactor. Son llamados quimiostatos.

La forma de operar continua indica que existe una corriente de entrada y otra de salida de tal modo que el volumen de líquido en el interior del reactor permanece constante.

Las ventajas más importantes en la operación en continuo es el aumento de la productividad donde se ahorran costes de capital, la reducción de los costes de operación, es decir, la mano de obra y la energía y el logro del control del proceso.

Estas ventajas se hacen más evidentes en procesos a gran escala.

Si se considera que el sustrato es el componente limitante se puede decir que la velocidad volumétrica de crecimiento es μX y si la operación se da en régimen estacionario, obviando los periodos de arranques y parada, la acumulación se hace cero. Además haciendo los caudales de entrada y de salida iguales el balance de materia que se tiene es el que se desarrolla ahora, aplicado a la biomasa:

$$V \cdot r_X + Q \cdot (X_e - X) = 0$$

Según el modelo de Monod:

$$r_x = \mu \cdot X$$

Y sabiendo que el tiempo de residencia es: $\theta = \frac{V}{Q}$

Y que la inversa del tiempo de residencia es la velocidad de dilución, entonces la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente manera:

$$\mu \cdot X = \frac{1}{\theta} \cdot (X - X_e) = D \cdot (X - X_e)$$

Reordenando:

$$D \cdot X_e = (D - \mu) \cdot X$$

En la mayoría de los casos la alimentación al reactor es estéril, es decir, su concentración de biomasa a la entrada es nula, $X_e = 0$.

Según esto se obtiene:

$$\mu = D$$

Es decir, la velocidad de crecimiento específica es igual a la de dilución.

Si se aplica el balance de materia al producto se puede obtener el valor de la productividad global, es decir, la velocidad con que se genera el producto, en función del caudal de operación y del producto obtenido:

$$r_p = D \cdot (P - P_e)$$

Normalmente la concentración de producto en la corriente de alimentación de sustrato suele ser nula, $P_e = 0$.

Se sabe que $Y_{\frac{P}{X}} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{\text{Producto Producido}}{\text{Crecimiento Microbiano}} = \frac{g / mol P}{g / mol X}$

$$r_p = D \cdot P = Y_{\frac{P}{X}} \cdot \mu \cdot X$$

Esta ecuación relaciona la productividad global con la velocidad específica de crecimiento.

Aplicando el balance para el sustrato, considerando que la velocidad de consumo del sustrato es igual a la suma de la velocidad de crecimiento celular y de producción de etanol, y si además se introducen los conceptos de rendimientos anteriormente expuestos, se tiene la siguiente ecuación de balance:

$$-r_s = - \left[\frac{r_x}{Y_{\frac{X}{S}}} + \frac{r_p}{Y_{\frac{P}{S}}} \right] = D \cdot (S - S_e)$$

1. Modelo de Monod para el quimiostato

Si se considera que el crecimiento celular sigue una cinética tipo Monod se puede modelizar el comportamiento de un quimiostato en régimen estacionario (Acumulación nula)

Biomasa (X)

$$D \cdot X_e + \left[\frac{\mu \cdot S}{(K_s + S)} - D \right] \cdot X = 0$$

Sustrato (S)

$$D \cdot (S_e - S) - \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{Y_{X/S} \cdot (K_s + S)} - \frac{X \cdot r_p}{Y_{P/S}} = 0$$

Producto (P)

$$D \cdot (P_e - P) + Y_{P/X} \cdot \frac{\mu_m \cdot S}{(K_s + S)} \cdot X = 0$$

Las variables X, S y P definen el estado del proceso.

D, S_e, P_e y X_e son variables que se fijan desde el exterior, en el caso de P_e y X_e sus valores se suelen anular ya que se decide que a la entrada del caudal de alimentación la concentración de microorganismo y etanol sean nulas.

μ_m, K_s, Y_{X/S} e Y_{P/S} son parámetros cinéticos y estequiométricos característicos del proceso. Es decir, se pueden encontrar tabulados dadas unas condiciones de operación precisas.

Con todo esto, las ecuaciones anteriores se pueden resolver si los valores a la entrada de producto y de células son cero (alimentación estéril), y con ello se obtienen las siguientes expresiones:

$$X = Y_{X/S} \cdot \left[S_e - \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D} \right] \text{ ec.1}$$

$$S = \frac{D \cdot K_s}{\mu_m - D}$$

$$P = \frac{Y_{P/X} \cdot \mu \cdot X}{D}$$

$$D = \frac{Q}{V}$$

Siendo X, S y P las concentraciones de biomasa, sustrato y producto en el interior del reactor.

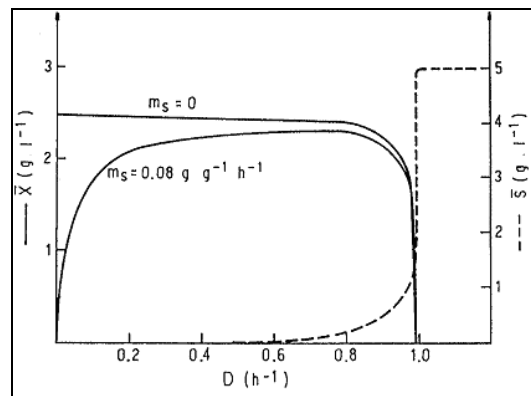


Fig. 34 Cultivo continuo. Concentración de biomasa y de sustrato limitante en estado estacionario a distintos valores de D . Parámetros: $\mu_m = 1 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0,5$, $K_s = 0,05 \text{ g/l}$ $S_i = 5 \text{ g/l}$

Para caudales bajos la velocidad de dilución (D) tiende a cero y como consecuencia la concentración de sustrato en el interior del equipo se hace muy pequeña ($S \rightarrow 0$). Por lo contrario la concentración de biomasa aumenta haciéndose máxima.

A medida que aumenta la velocidad de dilución (D) la concentración de sustrato en el reactor va aumentando, esto se traduce en una menor conversión del sustrato.

Cuando la velocidad de dilución se iguala a la velocidad específica de crecimiento de las células ($D = \mu_m$) se da un fenómeno importante: el lavado del reactor. En este punto el flujo de biomasa hacia el exterior ($D \cdot X$) es mayor al flujo aportado por el crecimiento celular ($\mu \cdot X$) ya que $\mu < \mu_m$. Y por tanto se produce un descenso considerable en la concentración de biomasa en el reactor. Atendiendo a la ecuación de balance para la biomasa se tendría un valor infinitésimo de microorganismos. La concentración celular sería prácticamente nula. También la concentración del producto sería muy pequeña ya que la velocidad de dilución es máxima.

En este caso, si los rendimientos $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ son constantes, la evolución de la concentración de biomasa y de producto son similares y sus curvas paralelas.

Operar cerca de las condiciones de lavado es beneficioso ya que la productividad se hace máxima, pero a la vez es arriesgado ya que cualquier cambio en las variables del proceso (temperatura, concentración de entrada de sustrato, caudales...) pueden llevar a la fatalidad, es decir, al lavado del reactor y hacer así la concentración de biomasa nula.

Es decir, operando en un punto próximo al crítico se consigue máxima productividad celular y de producto.

Igualando a cero el valor de la concentración de biomasa en el reactor, en la ec. 1 se puede calcular el valor crítico de D , el cual no debe superar:

$$D_C = \mu_m \frac{S_e}{K_s + S_e}$$

Para controlar que la velocidad de dilución no llegue al valor crítico se ha de cumplir en todo punto del reactor $D < \mu_m$.

El valor de D que maximiza la productividad es el siguiente:

$$D_m = \mu_m \cdot \left[1 - \left(\frac{K_s}{K_s + S_e} \right)^{0,5} \right]$$

2. Régimen no estacionario

Si se opera en régimen transitorio, el término de acumulación se ha de incluir en las ecuaciones de balance y se tendrá un sistema de ecuaciones diferenciales como el que se presenta a continuación:

Para la biomasa (X):

$$\frac{dX}{dt} = D \cdot (X_e - X) - \mu \cdot X$$

Para el sustrato (S):

$$\frac{dS}{dt} = D(S_e - S) - X \cdot \left[\frac{\mu}{Y_{X/S}} - \frac{r_{PX}}{Y_{P/S}} \right]$$

Para el producto:

$$\frac{dP}{dt} = D \cdot (P_e - P) - r_{PX} \cdot X$$

7.10 Reactores continuos de tanque agitado conectados en serie

La asociación de reactores de tanque agitado conectados en serie es ventajosa cuando la cinética del proceso biológico es inicialmente autocatalítica y su comportamiento posterior cambia a estado estacionario hasta terminar en la fase de la muerte celular. También resulta interesante su uso en los casos en donde el producto actúa como inhibidor.

La configuración en cascada permite una mejor aireación además de la variación de las condiciones en etapas sucesivas.

El primer reactor de una configuración en serie, es similar al reactor que opera de forma continua en solitario.

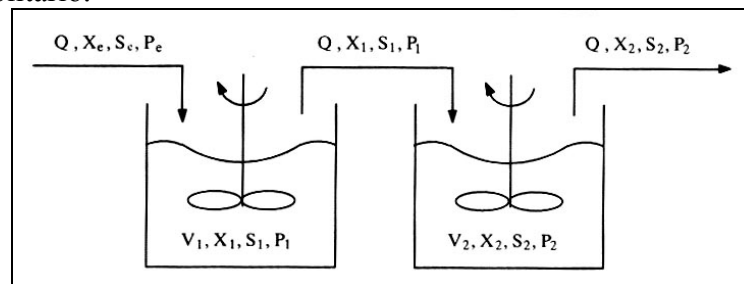


Fig. 35 Reactores mezcla perfecta en serie

La concentración de sustrato a la entrada del segundo reactor, S_1 , considerando que la alimentación al primer reactor estuviese exenta de etanol y de microorganismos, se calcula igual que en el reactor de tanque agitado solitario:

$$X_e = P_e = 0$$

$$S_1 = \frac{D_1 \cdot K_s}{\mu_m - D_1}$$

La concentración de biomasa en la corriente de entrada al segundo reactor, X_1 , se calcula de igual manera que cuando se tenía un solo reactor:

$$X_1 = Y_{\frac{X}{S_1}} \cdot \left[S_e - \frac{D_1 \cdot K_s}{\mu_m - D_1} \right]$$

D_1 es la nueva velocidad de dilución del segundo reactor.

Si los volúmenes de todos los reactores son iguales, como el caudal permanece constante se cumpliría que todas las velocidades de dilución son similares.

Realizando un balance de materia den el segundo reactor, incluyendo el término de acumulación, es decir, haciendo el balance en régimen transitorio se tiene:

$$V_2 \cdot \frac{dX_2}{dt} = \mu_2 \cdot V_2 \cdot X_2 + Q \cdot (X_1 - X_2)$$

Y si se considera que se opera en régimen estacionario, el término de acumulación se anularía y se podría despejar la concentración celular en el interior del segundo reactor:

$$X_2 = \frac{D_2 \cdot X_1}{D_2 - \mu_2}$$

Si el rendimiento en el segundo tanque permanece constante de la anterior ecuación se puede obtener la concentración de sustrato en el segundo reactor:

$$S_2 = S_1 - \frac{\mu_2 \cdot X_1}{Y_{\frac{X}{S_2}} \cdot (D_2 + \mu_2)}$$

Si se asume que el microorganismo sigue una cinética de Monod se puede determinar la concentración de sustrato en el segundo reactor a través de las condiciones de operación hidráulica (D_1 , D_2), en función de la temperatura, la cual afecta sobre los coeficientes cinéticos (μ , K_s) y según la concentración de entrada de nutrientes al primer reactor (S_e)

Así se llega a una ecuación de segundo grado con dos soluciones, donde una será la real.

$$(\mu_m - D_2) \cdot S_2^2 + \left[\frac{D_1 \cdot D_2 \cdot K_s}{\mu - D_1} - D_2 \cdot K_s - \mu \cdot S_e \cdot S_2 \right] + \frac{D_1 \cdot D_2 \cdot K_s^2}{\mu_m - D_1}$$

Otra manera de expresar la concentración de biomasa en el segundo reactor es a través del concepto de rendimiento celular, si éste permanece constante de reactor a reactor.

$$X_2 = Y_{\frac{X}{S}} \cdot (S_e - S_2)$$

Este procedimiento se puede extender para un número N de reactores en serie.

Si se considera que en el proceso de fermentación se puede caracterizar por una sola variable, como lo es la concentración de sustrato o de biomasa, a partir de los datos cinéticos de productividad de etanol resultado a partir de la operación en un reactor discontinuo de tanque agitado, se podría obtener el número de etapas necesarias para alcanzar una determinada conversión de materias primas.

El método usado sería gráfico y sencillo.

Se trata de trazar una recta de pendiente la velocidad de dilución (D) a partir del valor inicial de concentración de sustrato (S_e), esta recta cortará a la curva cinética de la generación de producto o crecimiento microbiano. En el punto en donde corta indicará la concentración de salida de sustrato (S_1) del primer reactor, se hallará trazando una recta vertical hacia abajo.

Si se supone que el tamaño de todos los reactores en serie son iguales, $D = \text{constante}$, entonces las rectas de operación serán paralelas. A partir de S_1 se traza una recta de pendiente D y se haya la concentración de sustrato a la salida del segundo reactor, y así sucesivamente hasta llegar a agotar tal concentración y dar con la conversión requerida. De esta forma se calcula el número de reactores necesarios para llegar a una determinada eficacia.

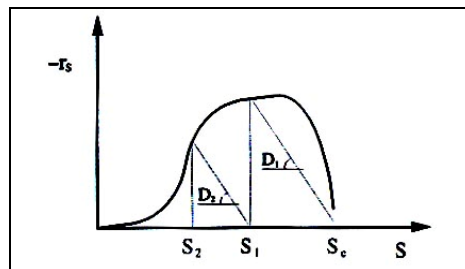


Fig. 36 Número de etapas de reacción

Se ha de tener en cuenta que al suponer un solo componente limitante se está simplificando de manera muy considerable ya que en muchos procesos la productividad y el propio crecimiento celular depende de una infinidad de variables y factores.

Este método sólo pretende dar un valor aproximado del número de etapas, es sólo una estimación para el diseño preliminar.

El diseño definitivo del proceso debe estar basado en experimentos en laboratorio y en planta piloto.

7.11 Reactores continuos de tanque agitado con recirculación celular

Esta configuración conlleva la adición de un equipo de separación, ya que para aumentar la concentración celular reutilizándola se deberá de separar previamente una vez que sale del reactor.

Una parte de la corriente de salida del reactor se introduce en un equipo de separación de biomasa, como puede ser un centrifugador, una columna de decantación, a través de ultrafiltración, o cualquier operación de separación que sea apropiada.

La concentración celular del reactor se puede controlar a través del caudal de purga de microorganismos.

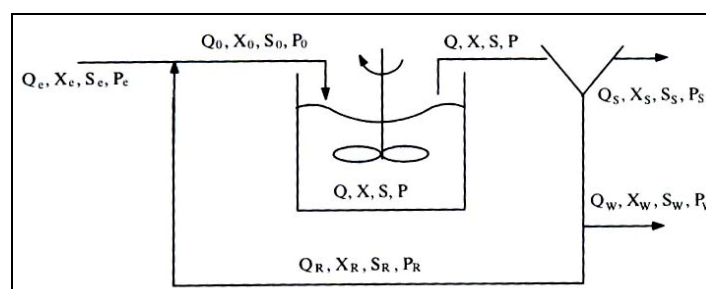


Fig. 37 Reactor de mezcla completa con recirculación

El balance de materia para la biomasa es el que sigue:

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot V + (Q_e \cdot X_e + Q_R \cdot X_R) - (Q_e + Q_R) \cdot X$$

$$Q = Q_e$$

Normalmente se cumple la siguiente desigualdad:

$$Q_e \cdot X_e \ll Q_R \cdot X_R$$

Ya que la concentración de microorganismos de la corriente de entrada suele ser nula porque la alimentación es estéril.

Si se expresa el caudal de recirculación en función de la tasa de recirculación y se supone que el régimen de circulación es el estacionario, la ecuación de balance queda de la siguiente manera:

$$Q_R = R \cdot Q_e$$

$$0 = \mu \cdot X \cdot V + R \cdot Q_e \cdot X_R - Q_e \cdot (1 + R) \cdot X$$

Si se divide entre el volumen (V) todos los términos de la ecuación y sabiendo que la velocidad de dilución es $D = \frac{Q_e}{V}$, de la ecuación anterior se tiene:

$$D = \frac{\mu}{1 + R \cdot \left(\frac{X_R}{X} - 1 \right)}$$

Y la concentración de biomasa en el reactor es la siguiente:

$$X = \frac{R \cdot D \cdot X_R}{D + D \cdot R - \mu}$$

Como se ve, la concentración celular en el interior del tanque se puede variar según la tasa de recirculación. También depende de la velocidad de dilución y de la eficacia del sistema empleado para la operación de separación de la biomasa.

La ventaja principal de este modo de operar es que se puede llegar a velocidades de dilución mayores sin sobrepasar los límites de lavado.

La concentración celular en la corriente de recirculación siempre será mayor que la existente en el interior del reactor, es decir se cumple la siguiente desigualdad con el consecuente efecto:

$$X_R > X \rightarrow \frac{X_R}{X} > 1 \rightarrow 1 + R \cdot \left(\frac{X_R}{X} - 1 \right) < 1 + R \rightarrow D > \mu$$

Al ser $D > \mu$ implica que se puede operar a velocidades de dilución mayores que la específica de crecimiento, así los caudales de operación pueden ser mayores y hacen aumentar la productividad global volumétrica del sistema.

Además de evitar los riesgos derivados por la operación próxima al punto crítico donde cualquier inestabilidad del sistema provocaba el lavado del reactor.

Balance para el sustrato

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = Q_e \cdot S_e + Q_R \cdot S_R - Q_0 \cdot S - r_s \cdot V$$

Como:

$$r_s = r_{sx} + r_{sp} = X \cdot \left[\frac{\mu}{Y_{x/s}} + \frac{r_p}{Y_{p/s}} \right]$$

Supuesto régimen estacionario, la acumulación es cero.

$$Q_e \cdot (S_e + R \cdot S_R) - Q_e \cdot (1 + R) \cdot S - V \cdot X \cdot \left[\frac{\mu}{Y_{x/s}} + \frac{r_p}{Y_{p/s}} \right] = 0$$

$$S_R = S = S_s$$

Si se divide la anterior ecuación entre $V \cdot X$

$$D \cdot \frac{S_e - S}{X} = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + \frac{r_p}{Y_{p/s}}$$

Si se aplica el balance de materia para el producto resulta:

$$V \cdot \frac{dP}{dt} = Q_0 \cdot P_0 - Q_0 \cdot P - r_p \cdot V$$

Si se considera que se está en estado estacionario, además de tener en cuenta que la separación de la corriente de salida en dos no influye sobre la concentración, se tiene:

$$P_R = P$$

Dividiendo entre $V \cdot X$,

$$D \cdot (P_e - P) + r_p \cdot X = 0$$

Tiempo de retención celular (θ_C): Se define como la relación entre el contenido de biomasa en el reactor (VX) y la salida neta de biomasa del sistema, que es la producción neta (salida + purga – entrada)

$$\theta_C = \frac{V \cdot X}{Q_w \cdot X_w + Q_s \cdot X_s - Q_e \cdot X_e}$$

Normalmente la alimentación es estéril y entonces se da la siguiente desigualdad:

$$Q_e \cdot X_e \ll 1$$

Y si la eficacia del equipo separador es buena, se cumple:

$$Q_s \cdot X_s \ll Q_w \cdot X_w$$

Entonces el tiempo de retención celular se puede definir como:

$$\theta_C = \frac{V \cdot X}{Q_w \cdot X_w}$$

El tiempo de residencia en el reactor se expresa como la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{V}{Q_0} = \frac{V}{Q_e \cdot (1 + R)}$$

7.12 Aeración, agitación y esterilización

La escala de distancias celular es muy diferente de la escala en un reactor biológico, ya que las distancias entre las células, nutrientes y productos (metabolitos) son mucho mayores.

Por esta razón los fenómenos de transporte de materia toman tanta importancia estos tipos de procesos, hasta afectar a la velocidad global del proceso más aún que la velocidad de reacción.

Los fenómenos de transporte cobran más importancia si se trabaja con células inmovilizadas que si se usan células libres, ya que en el primer caso la difusión de metabolitos, productos y oxígeno se ve limitada por el soporte de inmovilización.

De todas formas, en todo proceso se deben considerar los efectos de los fenómenos de transporte ya que al existir más de una fase en el sistema, se ha de estudiar la transferencia de materia entre ellas y sus limitaciones.

Se ha de tener en cuenta los problemas de transporte de materia, cantidad de movimiento y energía a la hora de aumentar la eficacia de un sistema.

En los cultivos aerobios se ha de suministrar oxígeno y esto conlleva una buena transferencia de materia entre las fases para conseguir una buena aeración y aumentar el crecimiento celular.

La agitación en los reactores de mezcla completa son los responsables del transporte de cantidad de movimiento.

Y la esterilización térmica es un caso de transmisión térmica.

Además si se quiere llevar al reactor a una temperatura comprendida entre 30 y 37 °C, que es la óptima para la fermentación de la glucosa, se necesitará un sistema de calentamiento.

Si usamos un sistema indirecto, como el paso de agua por la camisa del reactor a una temperatura tal que haga que el interior esté dentro del anterior rango de temperaturas, se deberá considerar fenómenos de transferencia de calor entre las paredes del reactor con el agua circulante de la camisa.

Se pueden comparar las productividades máximas de ambas células mediante el uso de glucosa como fuente de carbón:

En el caso de la levadura se obtiene 82 g/lh de etanol, y para la bacteria 120 g/lh.

Además también se ha comprobado que la velocidad de formación de etanol es 2,9 veces mayor, medida en g/gh.

Y también la velocidad de toma de glucosa es superior en el caso de la bacteria.

Se debe decir que la bacteria de tipo *Zymomonas mobilis* tampoco es capaz de sintetizar los azúcares de cinco carbonos.

Esto no es problema ya que se puede usar la ingeniería biomolecular para cambiar el metabolismo de tales microorganismos y hacerlos más eficientes.

Aeración

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, en los procesos aerobios se necesita de una buena aeración.

La concentración de saturación de oxígeno en condiciones normales de cultivo es de aproximadamente unos 10 mg/l, una concentración baja e insuficiente para abastecer a un cultivo aerobio.

Por ello se debe suministrar oxígeno de forma continua al reactor y así asegurar la actividad celular. Este oxígeno debe transferirse desde la fase gas hasta la fase líquida, y en esta última ser utilizado por los microorganismos que se encuentran en el medio.

La fase gas es la burbuja de aire que va ascendiendo por el reactor, ya que la corriente de aire introducida a éste se deberá de hacer por la parte inferior, así recorrerá todo el reactor y se asegurará la transferencia a la fase líquida, que será la disolución en el medio de cultivo.

La ecuación básica que describe este fenómeno de transferencia de materia será la siguiente:

$$N_{O_2} = k_L (C_L - C_i) \quad [5]$$

Donde N_{O_2} es la densidad de flujo de oxígeno entre fases, (moles/s m²)

C_L es la concentración de oxígeno en la fase líquida (moles/l)

C_i es la concentración de oxígeno en la interfase (moles/l)

k_L es un coeficiente individual de transferencia de materia entre fases.

La ecuación 5 se puede escribir usando un coeficiente de transferencia de materia global y así sustituir la concentración de oxígeno en la interfase por la concentración de oxígeno en el equilibrio, es decir, la concentración de saturación del oxígeno.

El resultado es el siguiente:

$$N'_{O_2} = K_L a (C_L - C^*) \quad (ec.2)$$

Siendo K_L un coeficiente de transferencia global,

a es la relación entre el área interfacial y el volumen de reactor (m² interfase/m³ reactor)

C^* es la concentración de oxígeno en la fase líquida correspondiente a la saturación.

El uso de coeficientes globales tiene su razón en que así se evita el cálculo de la concentración de oxígeno en la interfase, ya que esto es difícil de hallar. Sin embargo no es difícil calcular la concentración de oxígeno en el equilibrio.

Para calcular el consumo de oxígeno por parte de la biomasa se usa el concepto de velocidad específica de consumo de oxígeno, que es el oxígeno consumido por unidad de biomasa y de tiempo.

Para un régimen estacionario se ha de cumplir la siguiente ecuación:

$$N'_{O_2} = X Q_{O_2} \quad (ec.3)$$

Es decir que las velocidades de transferencia de oxígeno y el consumo de éste son iguales.

X es la concentración celular (moles biomasa/l) y Q_{O_2} es la velocidad de consumo del oxígeno (moles O₂/moles biomasa s).

Como $Y_{X/O} = \frac{\mu_X}{Q_{O_2}}$ entonces la ec.3 quedaría de la siguiente forma:

$$K_L a (C_L - C^*) = \frac{\mu_X}{Y_{X/O}} X \quad (ec.4)$$

Esta ecuación es muy importante ya que relaciona la capacidad del reactor de transferencia de oxígeno con la velocidad de crecimiento celular como consecuencia directa.

Por ello es de vital importancia hallar el coeficiente global de transferencia. Su valor indicará la eficacia de aeración.

La determinación del coeficiente ha de ser experimental y se ha de llevar a cabo en unas condiciones determinadas del cultivo. Su valor dependerá fuertemente de las condiciones de operación, sobre todo influirá el régimen de circulación dentro del reactor.

La determinación del coeficiente global de transferencia se hace a partir de un sencillo balance de oxígeno:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a(C^* - C) - XQ_{O_2}$$

Donde el primer término corresponde a la acumulación, el segundo al flujo de oxígeno hacia la fase gas y el tercero al consumo por parte de los microorganismos.

La obtención del coeficiente se hace usualmente a través de métodos directos durante el proceso de fermentación.

El balance de oxígeno podría escribirse de la siguiente forma:

$$V \frac{dc}{dt} = Q_E C_E - Q_S C_S - VXQ_{O_2}$$

V es el volumen del reactor, $Q_{E/S}$ son los caudales de gas (aire u oxígeno) a la entrada y a la salida respectivamente, $C_{E/S}$ son las concentraciones de oxígeno en los caudales de entrada y salida respectivamente.

El término correspondiente a la acumulación se anula cuando el reactor llega a régimen estacionario. Es decir, todo lo que entra sale o se consume.

Entonces en estado estacionario tenemos la siguiente ecuación:

$$Q_E C_E - Q_S C_S = VXQ_{O_2} \text{ (ec. 6)}$$

Combinando las ecuaciones 3 y 6 y considerando que el caudal permanece constante, $Q = Q_E = Q_S$ se tiene lo siguiente:

$$K_L a = \frac{Q (C_E - C_S)}{V (C^* - C)}$$

Mediante el uso de analizadores de gases se puede medir la concentración del oxígeno en el caudal del gas.

Para los casos en que el volumen del reactor sea grande se ha de considerar cambios importantes de la concentración de saturación del oxígeno a diferentes alturas, como los dos extremos del reactor. Se tendrán en cuenta las concentraciones de saturación en la superficie y en el fondo del reactor, ya que debido a las diferencias importantes de presión provocadas por la columna de líquido puede existir bastante variación.

Por eso, para el gradiente $(C^* - C)$ se tomará el valor de la media logarítmica.

Los parámetros que afectan al coeficiente de transferencia de materia son todos aquellos que son capaces de modificar la velocidad global de transferencia, ya sea mejorando las condiciones de circulación o el área efectiva de transporte.

El caudal de aire suministrado al reactor comprende valores de entre 0,5 y 1,5 volúmenes de aire por volúmenes de reactor y minuto.

La velocidad superficial de una burbuja de aire es el caudal de gas dividido entre el área transversal del reactor, si se aumenta mucho el caudal, esta velocidad será mayor y como consecuencia el tiempo de residencia de tales burbujas de aire en el tanque será menor e insuficiente para conseguir una buena aeración.

Por este motivo, el caudal de aire suministrado también influye en el coeficiente de transferencia de oxígeno ya que al aumentarlo disminuye el tiempo de residencia y con ello también lo hace la transferencia de oxígeno.

Además hay que tener en cuenta que si aumenta mucho la velocidad de burbujeo se puede producir la cavitación del sistema mecánico de agitación, en el caso en que lo hubiese.

Para mejorar considerablemente la transferencia del oxígeno a la fase líquida se acude a sistemas con agitación.

La agitación aumenta el área de transferencia por la aparición de burbujas de pequeño tamaño que se dispersan por el líquido aumentando así su tiempo de residencia en el reactor.

Con una buena agitación se llega al régimen turbulento y así se disminuye el grosor de la película líquida en la interfase gas-líquido y se favorece la difusión del oxígeno. Ésta deja de ser una difusión molecular para pasar a ser una difusión turbulenta, mucho más eficaz.

El grado de agitación está relacionado con la potencia consumida expresada por unidad de volumen de reactor.

Existen correlaciones para tanques agitados que permiten estimar el valor del coeficiente de transferencia según el tamaño del reactor y de las características del medio de cultivo. Estos dependen de los valores de la viscosidad.

La siguiente correlación presentada por Blanch y Clark para medios de baja viscosidad:

$$K_L a = 2,610^{-2} \left(\frac{Pg}{V} \right)^x V_s^y$$

Pg = potencia absorbida en un sistema aerado (W)

V = volumen de líquido en el tanque (m^3)

V_s = velocidad superficial del gas (m/s)

x = coeficiente de valor 0,4 -0,7 para dispersiones claras y medios turbios respectivamente

y = coeficiente de valor 0,5-0,2 para dispersiones claras y turbias respectivamente.

$K_L a$ (s^{-1})

El valor de Pg/V está dentro del rango 500-10000 w/ m^3 .

Para medios viscosos se tiene una correlación más compleja, donde el cálculo se hace mediante números adimensionales y entra en juego el diámetro del impulsor, la tensión superficial, la velocidad de agitación y la difusividad del oxígeno.

$$\frac{K_L a D^2}{D_{O_2}} = 0,06 \left(\frac{\mu_{ap}}{\rho D_{O_2}} \right)^{0,5} \left(\frac{\mu_{ap} v_s}{\sigma} \right)^{0,6} \left(\frac{D^2 N \rho}{\mu_{ap}} \right)^{1,5} \left(\frac{D N^2}{g} \right)^{0,19} \left(\frac{D N}{v_s} \right)^{0,32}$$

D = diámetro del impulsor

D_{O_2} = Difusividad del oxígeno

μ_{ap} = Viscosidad aparente

v_s = velocidad superficial del gas

σ = tensión superficial

N = velocidad de agitación

ρ = Densidad del líquido

g = gravedad

Además del grado de agitación y de la velocidad superficial de la burbuja de gas, existen otros factores que afectan al coeficiente de transferencia tales como la viscosidad, la existencia de espumas y de antiespumantes.

La viscosidad del medio va variando conforme avanza el proceso de fermentación, haciéndose más viscosa y dificultando la transferencia, sobretodo si se da la formación de agregados de la biomasa. Así el medio puede dejar de tener un comportamiento newtoniano.

Un alto grado de agitación y aeración suele producir espumas. Las espumas se forman a causa de la presencia de moléculas con propiedades tensoactivas (péptidos)

Las espumas reducen la transferencia de oxígeno por dos causas:

Las burbujas pueden ser atrapadas por las espumas y ser recirculadas de tal forma que se aumenta el tiempo de residencia considerablemente. Esto a primera vista podría parecer beneficioso pero al aumentar demasiado el tiempo de permanencia en el sistema se tiene burbujas con muy bajo contenido de oxígeno, son burbujas agotadas.

Además su acumulación entre la superficie del líquido y la fase gaseosa actúa como una barrera física para el paso de moléculas de oxígeno de una fase a otra.

La formación de espumas es un fenómeno a evitar ya que reduce la transferencia y también provoca problemas operacionales provocados por la salida de éstas por los conductos de aire.

La adición de antiespumantes tiene dos efectos contrarios, uno que favorece la transferencia y otro que la disminuye.

Los antiespumantes son sustancias tensactivas, por esta razón aumentan la superficie interfacial (a , m^2/m^3 de fermentador)

Pero también disminuye de forma drástica el coeficiente K_L debido a la acumulación de tensoactivos en la interfase.

El efecto global sobre el coeficiente de transferencia K_{La} es normalmente negativo.

Otro factor a tener en cuenta para mejorar la transferencia es el tipo de burbujeador empleado. Éste influirá directamente en el tamaño de las burbujas y como consecuencia en el valor del coeficiente de transferencia.

Para resumir los parámetros que más afectan al valor del coeficiente de transferencia K_{La} son los siguientes, en orden de importancia:

Agitación, viscosidad del medio, caudal de gas suministrado, antiespumantes y tipo de burbujeador.

Se pretende un alto coeficiente para así mejorar la aeración del cultivo y obtener un alto rendimiento en el crecimiento celular.

En definitiva hay tres efectos por los cuales una buena aireación favorece el rendimiento:

- El libre y constante abastecimiento de oxígeno para las células en el caldo nutritivo hará aumentar el crecimiento de éstas.
- La aireación elimina de forma rápida la presencia del dióxido de carbono, éste aún siendo en pequeñas concentraciones tiene un gran efecto inhibidor.
- Se consigue mantener en suspensión las células por el permanente burbujeo y así se renueva constantemente la zona de contacto entre la membrana celular y el sustrato.

Agitación

La agitación se puede definir mediante la relación existente entre la potencia consumida por el sistema y las variables de operación. La potencia absorbida durante la agitación de un mecanismo se representa a través del número de potencia N_p . Este número adimensional dependerá de si el sistema está aireado o si no lo está.

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

P = potencia absorbida por el agitador

ρ = densidad del líquido

N = velocidad de agitación

D = diámetro del impulsor

El número de potencia se puede correlacionar con módulos adimensionales que describen el movimiento del líquido en el interior del tanque, tales como es el número de Reynolds para la agitación:

$$Re = \frac{\rho D^2 N}{\mu}$$

Donde μ = viscosidad del líquido.

La relación entre los dos números se puede hacer usando la curva de potencia, que se representa genéricamente de la siguiente forma:

$$N_p = b Re^x$$

Siendo b = constante que depende de la geometría del tanque, x = exponente en función del régimen de circulación y tipo de impulsor.

Los tipos de impulsores más comunes son los siguientes:

La turbina de disco (Rushton), la turbina de palas planas y la hélice.

Según el régimen de circulación se tendrá una relación u otra.

Para $Re < 10$, Régimen Laminar, el N_p disminuye con el Re y la relación es la que sigue:

$$N_p = \frac{b}{Re}$$

Y la potencia suministrada al fluido $P = b\mu N^2 D^3$

Para $10 < Re < 1000$ se tiene una zona de transición donde la curva que relaciona el N_p y el Re depende de la geometría del tanque además de las condiciones de operación.

En el caso de $Re > 10000$ el régimen es turbulento y Re no influye prácticamente nada sobre el N_p . Las curvas se hacen planas en ese tramo y la potencia absorbida se calcula de la siguiente forma: $P = b\rho N^2 D^5$

La introducción de aire a un reactor agitado hace disminuir las necesidades de la potencia suministrada. Esto es a causa de la reducción de la densidad y de la viscosidad de la fase líquida sobretodo en la zona más próxima al impulsor por la presencia de burbujas de gas.

La agitación en sistemas aireados se sirve de un parámetro llamado “hold-up” o retención (ϵ_g) de la fase gas, que se define como el cociente entre el volumen de gas en el reactor y el volumen tota (gas + líquido)

$$\epsilon_g = \frac{V_g}{V_g + V_l}$$

El fluido es una dispersión de burbujas, así que el líquido tendrá una densidad ρ_g , que es menor que si no existiesen tales burbujas (ρ).

$$\rho_g < \rho$$

Y se relacionan mediante la siguiente ecuación:

$$\rho_g = \rho(1 - \epsilon_g)$$

La definición de N_p queda modificada de la siguiente forma:

$$N_p = \frac{P_g}{\rho N^3 D^5}$$

Donde P_g es la potencia absorbida por el sistema aireado y ρ_g la densidad aparente.

Relacionando las ecuaciones anteriores resulta:

$$\frac{P_g}{P} = \frac{\rho_g}{\rho} = (1 - \epsilon_g)$$

Mediante esta ecuación se calcula la disminución de potencia debida a la aeración.

Esta disminución se ve afectada por todas las variables que alteren el valor de ϵ_g , como puede ser la velocidad de agitación, el tamaño de burbuja, el tipo de agitador, la tensión superficial, la viscosidad,...

Para estimar las necesidades de potencia en un sistema aireado se hace uso de un módulo adimensional llamado módulo de aireación (N_a).

Este módulo se define como el cociente entre la velocidad superficial del gas y la velocidad tangencial en el extremo del impulsor.

El valor de Na indica el grado de dispersión de las burbujas alrededor del impulsor.

$$N_a = \frac{\frac{Q_g}{D^2}}{ND} = \frac{Q_g}{ND^3}$$

La relación entre el número de potencia y el módulo de aireación se obtiene mediante la existencia de correlaciones empíricas para cada tipo de agitador.

Esterilización

En todo proceso de fermentación se requiere la esterilización de los equipos a usar para así evitar la contaminación biológica.

La contaminación biológica es la invasión de microorganismos extraños, sin interés industrial, del proceso. Con ello se disminuye la productividad porque se da el crecimiento celular de la cepa productora también del contaminante biológico.

Además si se opera en continuo el microorganismo extraño puede desplazar al de interés.

A parte de estos problemas, el contaminante biológico puede degradar el producto final o producir la lisis celular.

Se deben de usar inóculos puros, esterilizar el medio de cultivo, el reactor, conductos, válvulas, aditivos y corrientes del proceso.

Se debe mantener las condiciones de esterilización durante el proceso de operación.

El proceso de esterilización consiste en la eliminación o destrucción de todos los microorganismos presentes capaces de competir con el organismo deseado.

Sabiendo las características específicas del cultivo de interés se pueden encontrar las condiciones de operación más extremas que permitan desarrollarse a este cultivo y no a ningún otro microorganismo. Se suele jugar con la temperatura y con el pH.

Este procedimiento sería de desinfección más que de esterilización.

La esterilización puede hacerse mediante calor húmedo o través de la filtración.

BIBLIOGRAFÍA

- Ingeniería bioquímica. Gódia Casablancas, F. y López Santín, J.
- Ingeniería bioquímica. Webb, F. C.
- Fabricación del alcohol. Palacio Llames, Hernán.
- Effects of varying media, temperature and growth rates on intracellular concentrations of yeast amino acids. Enrique Martinez and Tahía Benitez.
- Continuous culture applications. Tahía Benitez.
- Manual del ingeniero químico, volumen IV. Perry.
- Soluciones prácticas para el ingeniero químico. Carl R. Branan
- Agroenergética. José Luis Fernández-Cavada
- Microbiología Industrial. José Merchuk.
- Directiva del parlamento europeo y del consejo relativa del uso de biocarburantes en el transporte. Comisión de las comunidades europeas.
- Diseño y puesta en marcha de un sistema semicontinuo de fermentación para la producción de etanol mediante *Saccharomyces Cerevisiae*. Fabio R. Tarántola.
- Incremento de la producción de alcohol en fermentación de melazas mediante un complejo enzimático. Congreso colombiano de ingeniería química
- Alternativa viable para la agroindustria de la caña de azúcar. Manuel Enriquez Poy. Revista Ingenios. 1998
- Tecnología de la fermentación del etanol. *Mobilis de Zymomonas*. P. Gunasekaran y K. Chandra Raj.
- <http://ellaboratorio.servit.org>
- <http://monografias.com>
- <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles14.htm>
- <http://www.biologia.edu.ar/microind/>
- <http://www.corpodib.com/estudios1.htm>
- <http://es.geocities.com/centrifugacion/principiofisico.htm>
- <http://www.microbes.info/>