

Treball de Fi de Grau

Grau en enginyeria química

Disseny d'un bioreactor per a produir àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic

MEMÒRIA

Autor: Gerlac Via Martinez-Seara
Director: Jordi Bou
Convocatòria: Gener 2017



**Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona**



Resum

En aquest treball s'ha dissenyat un bioreactor per lots de 350 L per produir 350 kg anuals de l'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic a partir de 2-metil-1,3-propandiòl mitjançant una fermentació duta a terme pel bacteri *Gluconobacter oxydans*. Per fer-ne el disseny s'ha pres com a guia l'estudi fet sobre aquesta fermentació per Sang-Hyun Pyo (1).

S'ha començat amb una **Introducció Teòrica** que pretén posar-nos en el context d'aquest projecte. S'inicia amb un primer apartat que fa una descripció del panorama actual de les biorefineries. En el següent es fa una introducció dels microorganismes d'ús industrial i en particular dels que s'usaran en el nostre bioreactor, els *Gluconobacter oxydans*. A continuació es parla sobre l'estat de l'art de l'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic. Per finalitzar aquesta introducció teòrica s'estudien els tipus de bioreactors i els mètodes d'operació típics.

En el següent punt, **Materials i Equips**, es fa una breu explicació de l'origen de les referències que es trobaran al final del treball i dels softwares.

Tot seguit, en l'apartat **Resultats** és on es trobarà tots allò que té relació amb el disseny en sí. En aquest capítol hi ha especificades totes les decisions preses basades en la bibliografia sobre la temàtica. S'hi trobaran també totes les operacions que han calgut pel disseny.

Així doncs s'ha dissenyat un bioreactor per lots de 350 L (235L de volum de treball) amb unes dimensions $D=650$ mm i $H=980$ mm i una productivitat de 6.6 g/L al final de les 8 hores que dura la fermentació. S'han usat 4 deflectors per evitar la formació de vòrtex a causa de la forta agitació (500 rpm). Aquesta es basa en una doble turbina Rushton de $D=217$ mm impulsada per un motor de 3kW. L'aeració requerirà un motor de 100 W i es donarà mitjançant un anell ruixador d'igual diàmetre que la turbina. Finalment per mantenir la temperatura, al ser una fermentació curta, s'ha usat un aïllant, concretament un de 8 cm de gruix. Aquesta espessor ens assegurarà que la temperatura no baixi de 28°C durant la fermentació.

Ja per finalitzar s'ha fet un **Estudi econòmic** que ha resultat en un cost total del projecte de 17688,06 € i un **Estudi de l'impacte ambiental** on es calculen les emissions de CO₂, que han resultat en 11415.6 kg anuals.

En l'apartat **Organització del projecte** es pot veure com s'ha planificat tot el treball.

Sumari

RESUM.....	1
SUMARI.....	2
1. PREFACI	5
1.1. Motivació del projecte.....	5
1.2. Abast del projecte.....	5
2. OBJECTIUS.....	6
2.1. Objectiu general	6
2.2. Objectius particulars.....	6
3. INTRODUCCIÓ.....	7
3.1. Teoria 1: Les biorefineries, comparativa amb les refineries de petroli.....	7
3.1.1. Definició del concepte Biorefineria	7
3.1.2. Biomassa	8
3.1.3. Tipus de biorefineries	9
3.1.3.1. Convencionals.....	10
3.1.3.2. Whole Crop Biorefinaries (WCBR).....	10
3.1.3.3. Biorefineries Oleoquímiques	11
3.1.3.4. Lignocellulosic feedstock biorefineries.....	11
3.1.3.5. Green biorefineries.....	12
3.1.3.6. Biorefineries marines.....	13
3.1.4. Comparativa de les biorefineries amb la refineries petroquímiques.....	15
3.1.4.1. Intermedis base C2	17
3.1.4.2. Intermedis base C3	17
3.1.4.3. Intermedis base C4	18
3.2. Teoria 2: Microorganismes i els seus processos fermentatius. Cinètica del creixement microbià. 19	19
3.2.1. Microorganismes	19
3.2.1.1. Arqueus.....	20
3.2.1.2. Bacteris.....	20
3.2.1.3. Fongs	21
3.2.2. Perills associats amb l'ús industrial de microorganismes.....	23
3.2.3. Necessitats nutritives dels microbis	24

3.2.3.1.	Absorció dels nutrients	25
3.2.4.	Gluconobacter oxydans	26
3.2.4.1.	Efectes de les condicions en el cultiu	27
3.2.5.	Cinètica del creixement microbià	28
3.3.	Àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic. Estat de l'art i usos industrials.	34
3.3.1.	Importància de la quiralitat	34
3.3.2.	Obtenció de l'àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic	36
3.3.2.1.	Mètodes químics	36
3.3.2.2.	Mètodes biològics.....	37
3.3.3.	Ús industrial de l'àcid β -hidroxi-isobutíric	39
3.3.4.	Àcid metacrílic i metacrilat de metil.	42
3.3.4.1.	Procés d'obtenció	42
3.3.4.2.	Reaccions	43
3.4.	Fermentadors i bioreactors	44
3.4.1.	Efectes dels paràmetres químics i físics.....	45
3.4.1.1.	Temperatura	45
3.4.1.2.	pH.....	46
3.4.1.3.	Disponibilitat d'oxigen	46
3.4.1.4.	Espuma.....	47
3.4.2.	Control dels paràmetres químics i físics	47
3.4.2.1.	Agitació	47
3.4.2.2.	Transferència de calor	48
3.4.2.3.	Transferència de massa	49
3.4.2.4.	Addició de substàncies. pH i espuma	51
3.4.3.	Mètodes d'operació i tipus de fermentadors.....	52
3.4.3.1.	Procés continu	53
3.4.3.2.	Procés discontinu (batch)	54
3.4.3.3.	Procés fed-batch	54
3.4.4.	Esterilització	55
4.	MATERIALS I EQUIPS	57
5.	RESULTATS.....	58
5.1.	Condicions de la fermentació.....	59
5.1.1.	Subministrament d'oxigen.....	59
5.1.2.	Temperatura	61
5.1.3.	pH.....	62
5.1.4.	Espuma.....	63
5.1.5.	Agitació.....	63
5.1.6.	Cultiu i manteniment del microorganisme.....	64

5.2. Disseny de la fermentació.....	64
5.2.1. Duració dels cicles i productivitat	64
5.2.1. Disseny del fermentador pels microorganismes	66
5.2.2. Volum de treball i volum del fermentador	68
5.2.3. Paràmetres de forma del fermentador	69
5.2.4. Determinació de la geometria del recipient.....	70
5.2.5. Deflectors.....	71
5.2.6. Agitador i motor.....	72
5.2.7. Aeració	75
5.2.8. Disseny de l'aïllant	76
5.2.9. Vàlvules i ports	77
5.2.9.1. Tapa.....	77
5.2.9.2. Sortides	78
5.2.9.3. Vàlvules.....	80
5.3. Disseny en Solidworks®	80
5.4. Plànols del Disseny	85
5.5. Pla d'operacions i seguretat.....	89
6. ESTUDI ECONÒMIC	92
7. ESTUDI DE L'IMPACTE AMBIENTAL.....	93
8. ORGANITZACIÓ DEL PROJECTE	95
CONCLUSIONS	96
BIBLIOGRAFIA	97

1. Prefaci

1.1. Motivació del projecte

Entre els objectius de la Química i d'acord a les tendències de respecte pel medi ambient, hi ha la fabricació de productes de gran consum pels mitjans més eficients i nets possibles. Per això darrerament s'han proposat molts processos biològics per a obtenir productes que abans eren derivats dels petroli, indústria altament contaminant i responsable d'un gran impacte ambiental negatiu. Per aquesta raó la recerca de processos biològics amb uns rendiments semblants als que s'obtidria pels camins típics i amb un impacte ambiental molt menor és de gran importància.

Actualment l'àcid metacrílic i el metacrilat de metil s'obtenen per l'anomenada via ACH, a partir de la cianhidrina de l'acetona. Aquesta ruta, tot i ser la més utilitzada pels bons rendiments que dóna, usa primeres matèries molt contaminants, té uns costos de procés molt alts i produeix gran quantitat de subproductes. Així doncs trobar una forma alternativa per produir aquests monòmers és d'importància cabdal.

El producte que es vol obtenir, l'àcid 2-metil-3-hidroxidpropanoic, és una substància quiral. Sectors com el farmacèutic han augmentat la seva demanda de substàncies enantiomèricament pures, i l'ús d'intermedis quirals és de les millors formes d'obtenir-les.

1.2. Abast del projecte

Així doncs en aquest projecte es vol trobar una forma de produir a escala pilot una substància que de ben segur tindrà gran importància pels sectors mencionats: el farmacèutic i el dels plàstics. I aconseguir així una alternativa als processos actuals, molt perjudicials pel medi ambient.

El que proposarem aquí és un disseny d'un fermentador a escala pilot mitjançant uns microorganismes que ja tenen certa presència en la indústria, els *Gluconobacter oxydans*, i que tenen la característica de catalitzar la oxidació incompleta de alcohols i sucres a els corresponents aldehids, cetones i àcids carboxílics. A més a més és un organisme no patogen qualificat com a no perillós per a humans ni animals.

Aquesta és una temàtica poc estudiada però que ha pres certa importància darrerament, la majoria dels estudis relacionats amb aquesta fermentació daten dels últims 20 anys.

2. Objectius

2.1. Objectiu general

L'objectiu principal d'aquest treball serà dissenyar un fermentador a escala pilot per a produir 350 kg anuals d'àcid 2-metil-3hidroxipropanoic a partir de *Gluconobacters oxydans*. I mostrar les competències adquirides al llarg del grau d'Enginyeria Química per determinar totes les condicions operatives així com fer-ne el disseny en 3D i els plànols mitjançant un software pertinent.

2.2. Objectius particulars

Per tal d'assolir l'objectiu principal s'aniran assolint una sèrie d'objectius menors que desencadenaran en el disseny del fermentador, aquests són:

- i. Escollir un bacteri adequat per a la producció de l'àcid a partir de la bibliografia disponible.
- ii. Estudiar la cinètica de creixement i producció de l'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic.
- iii. Seleccionar el tipus de fermentador i el mètode d'operació idoni pels nostres interessos.
- iv. Determinar la geometria del fermentador.
- v. Seleccionar les condicions d'operació pertinents fent un estudi de la bibliografia disponible sobre la temàtica.
- vi. Presentar un disseny original del fermentador que inclogui les eleccions preses anteriorment.
- vii. Proposar un pla d'operacions.
- viii. Fer un estudi econòmic i un estudi de l'impacte ambiental.

3. Introducció

3.1. Teoria 1: Les biorefineries, comparativa amb les refineries de petroli

Cada vegada més es fan passes cap a un desenvolupament d'una economia més biològica reemplaçant així els materials fòssils en els processos industrials. Així com per la producció d'energia hi ha varies alternatives (eòlica, solar, nuclear, hidràulica..), per a la producció sostenible de productes comercialitzables com alternativa a la basada en primeres matèries fòssils no n'hi ha tantes. L'esgotament d'aquest materials fòssils, l'extrema volatilitat dels preus i la demanda fluctuant fan que siguin necessaris sistemes més robustos per tal de guanyar en competitivitat a llarg termini (2).

Aquest canvi en la economia implica l'ús de les anomenades biorefineries. Però què és una biorefineria?

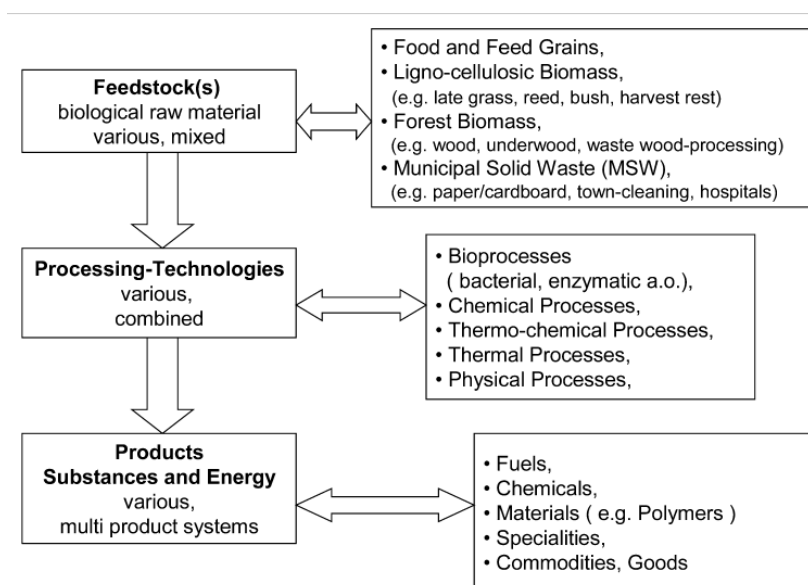
3.1.1. Definició del concepte Biorefineria

Biorefinar és el que s'entén com processament sostenible de biomassa cap a diferents productes comercialitzables i d'energia. Això vol dir que pot ser un procés, una instal·lació o bé una planta de processament.

Un dels factors de més importància en l'establiment d'un biorefineria és la seva sostenibilitat al llarg de tot el seu cicle de vida (construcció, operació i desmantellament). Així doncs s'hauran de tenir en compte diferents factors: la disponibilitat d'alimentació i de biomassa, l'impacte en l'ús de l'aigua i la seva qualitat o els riscos toxicològics i l'impacte en la biodiversitat, entre d'altres. Com que l'avaluació de la seva sostenibilitat no es pot fer en termes absoluts, s'acostuma a fer una comparativa amb els sistemes convencionals per a la producció dels mateixos productes i serveis, per exemple comparant un producte fet a partir de matèries fòssils amb un fet a partir de processos biològics.

No és un concepte completament nou. Hi ha molts exemples de processos tradicionals de conversió de biomassa que podrien ser quasi considerats com a propis d'una biorefineria. La utilització de la canya de sucre data des de el 6000 aC. a l'Àsia i la importació d'aquesta es va establir des de el s. XV. En aquest camp A.S. Marggraf,

científic alemany, va publicar el 1748 els seus estudis sobre l'obtenció de sucre a partir d'arrels i remolatxa. Tot i així no és fins els anys 90 que la utilització de recursos renovables per a la producció de productes no alimentaris fomenta la recerca i el desenvolupament, amb un creixement de l'atenció professada per la indústria i la política del moment. És en aquest moment quan apareix el terme "biorefineria". Aquest tipus de refinaria combina les tecnologies essencials per a transformar les primeres matèries biològiques en productes intermedis i finals (Il·lustració 1).



Il·lustració 1: Principis bàsics d'una biorefineria (3)

3.1.2. Biomassa

Les biorefineries utilitzen com a combustible la biomassa. Aquesta pot tenir molts orígens depenent de raons tals com la disponibilitat, la localització o el preu. Pot tenir una procedència forestal, venir de l'agricultura, de residus urbans i industrials o d'altres.

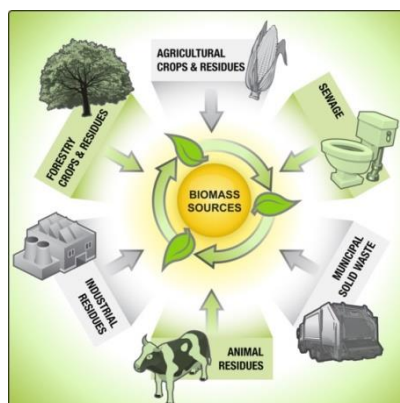
Actualment s'utilitzen $6 \cdot 10^9$ tones de les anualment produïdes, $1.7-2.0 \cdot 10^{11}$ tones. D'aquestes sols del 3 al 3.5% serveixen per aplicacions fora de l'alimentació

Hi ha moltes definicions per el terme biomassa, per exemple:

- Tota la matèria orgànica viva present en el nostre ecosistema.
- Tota la matèria vegetal constantment produïda per fotosíntesis amb un total anual de 170 billons de tones (excloent les plantes marines).
- La massa cel·lular de plantes animals i microorganismes usats com a matèries primeres en processos microbiològics

En el context industrial la seva definició seria la següent:

<< El terme biomassa industrial significa tota la matèria orgànica renovable disponible (exclosa la fusta antiga), inclosos els cultius i arbres dedicats al consum energètic, els aliments agrícoles i residus de les collites, les plantes aquàtiques, la fusta i els residus de fusta, les deixalles animals i altres residus materials utilitzables per propòsits industrials (energia, combustibles, productes químics, materials)>>



Il·lustració 2: Orígens de la biomassa. (4)

La majoria de les primeres matèries biològiques s'obtenen de l'agricultura i de la silvicultura. De la silvicultura per exemple se n'extreuen excel·lents matèries primeres per la producció de paper, cartró, la construcció i les indústries químiques. De les fruites per altra banda se n'extreuen molts productes orgànics útils per a produir combustibles, productes químics o biomaterials.

La biomassa igual que el petroli té una composició molt complexa. És necessària una separació primària cap als grups de substàncies principals. Posteriorment el tractament d'aquestes substàncies porta a un gran ventall de productes. A més a més, la biomassa pot ésser modificada durant la seva creació per adaptar-la als posteriors processos als que serà sotmesa. S'usa en aquest context el terme "precursors" (5).

3.1.3. Tipus de biorefineries

Dintre del concepte biorefineria hi ha diferències. Pot ésser que dues instal·lacions tinguin una alimentació diferent, que en una hi predomini un tipus de tecnologia diferent o bé acostumin a usar-se per obtenir diferents productes. Es fa tot seguit una breu descripció dels diferents grups que conformen el panorama actual de biorefineries, serveixin a fins comercials o no.

3.1.3.1. Convencionals

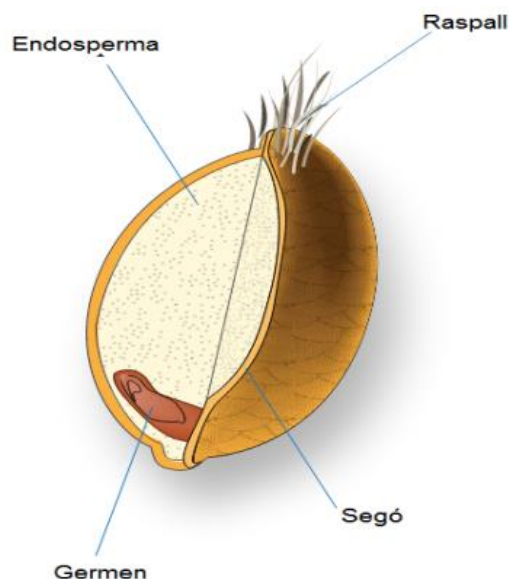
Biorefinar no és una cosa nova. Es podria dir que el biorefinament industrial va començar amb l'automatització de la fabricació del paper quan s'introduí la màquina de vapor en el segle XIX. Malgrat això, la majoria de les innovacions tenen relació amb la indústria alimentària.

Per exemple la producció industrial de midó de patata, iniciada per W. A. Scholten el 1839, es va veure afavorida per la disponibilitat d'aigua, bones terres de cultiu i facilitat de transport (hi havia canals existents usats per transportar torba). Més tard la mateixa empresa va començar a produir una gran ventall de productes inclosos biopolímers basats en el midó.

Un altre cas és la producció de sucre. El 1801 Franz Achard havia processava remolatxa sucraera per a produir sucre cristal·lí, usant processos que encara es fan servir (extracció, filtració, evaporació, cristallització, centrifugació). En el procés es produïa també melassa que més tard s'usà com a primera matèria en la producció de llevats, i encara més tard per a la producció d'etanol.

3.1.3.2. Whole Crop Biorefineries (WCBR)

Les biorefineries de cultiu complet processen gra i palla. Engloba la mòlta humida o seca i la subsegüent fermentació i destil·lació dels grans (blat, blat de moro i sègol).



Il·lustració 3: Detall d'una llavor de blat (4)

La mòlta humida s'inicia mullant el gra amb diòxid de sofre (SO_2) per estovar els nuclis i separar les closques del gra. S'utilitzen tecnologies molt comunes que permeten la separació del midó, la cel·lulosa, l'oli i les proteïnes.

En la mòlta seca es molen els grans complets, incloent el germen i el segó (capa externa del cereal). Després de la mòlta la farina es barreja amb aigua per a ser tractada amb enzims de liqüefacció i després, es cuina la pasta que queda per a descompondre el midó. Aquest pas es pot passar per alt si en el fermentador s'hi afegeixen a la vegada llevat fermentador i enzims sacarificadors.

Tant amb un tipus com en l'altre un cop feta la fermentació la pasta s'envia a través d'un sistema de columnes de destil·lació per seguidament passar per un seguit de processos on es concentra, purifica i deshidrata l'alcohol. La palla (incloent-ne els nodes, les closques i les fulles) forma un matèria primera per a biorefineries lignocel·lulòsiques.

3.1.3.3. Biorefineries Oleoquímiques

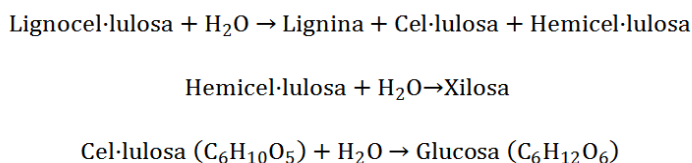
Són un cas especial de WCBR que combina la producció de dièsel i de productes fets d'olis vegetals. S'usen àcids i èsters grassos i glicerol provinent de cultius productors d'oli per a produir el que s'anomenen productes químics base, en anglès *platform chemicals*; monòmers funcionals, lubricants i surfactants.

A llarg termini, aquest tipus de biorefineries podrien produir primeres matèries renovables per a les refineries de petroli. L'èxit de les biorefineries correspon en gran mesura amb la seva integració amb les refineries ja existents i els productes base que ofereixen aquest tipus de biorefineries ofereixen un clar nexa d'unió. El procés NExBTL de Neste Oil demostra com poden interactuar els dos tipus de refineries. (6)

3.1.3.4. Lignocellulosic feedstock biorefineries

Aquest tipus de biorefineries engloba el refinament de biomassa lignocel·lulòsica a productes intermedis com la cel·lulosa, la hemicel·lulosa i la lignina, que després poden ser processats cap a un grapat de productes i bioenergia. Aquest tipus de biomassa s'espera que sigui la de més importància en un futur.

La lignocel·lulosa està formada per matèria seca de les plantes. És una de les matèries primeres més abundants per a la producció de biofuels. Aquesta biomassa es tracta amb agents alcalins o àcids per obtenir cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina. Els dos primers es converteixen després en manosa, glucosa (C6) i xilosa (C5) per hidròlisi enzimàtica.



Il·lustració 4: Equació general de conversió dels precursors en una biorefineria lignocel·lulòsica (2)

Aquests sucres C6 i C5 s'utilitzen quasi sempre com a primera matèria de fermentacions per a produir biofuels (etanol, butanol, hidrogen) i productes químics. La lignina s'usa normalment per a produir calor i energia per utilitzar internament o bé vendre-les.

Dins d'aquest tipus de biorefineria en trobem dos més que hi guarden estreta relació.

3.1.3.4.1. Biorefineria termoquímica (Syngas)

En aquest cas la biomassa lignocel·lulòsica rep un pretractament (disminució de mida, assecament i/o torrefacció) per permetre'n la gasificació arrastrada a pressió a alta temperatura i pressió mitjançant gas de síntesis.



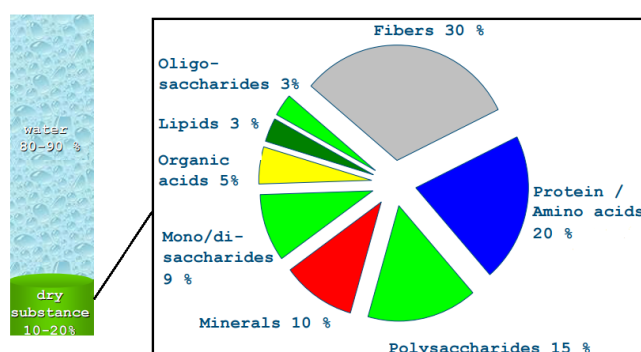
Il·lustració 5: Instruments utilitzats habitualment per efectuar la disminució de mida: molí de disc, molí de martells i molí de fulles (7)

El gas de síntesi és neteja en un sistema a alta temperatura per a tal fi, a vegades passant per un reformat de vapor per a modificar la relació CO/H₂ seguint els requisits posteriors. El gas ja net es pot usar per a produir biofuels i productes químics (com ara FT dièsel i dimetilèter), un llarg ventall d'alcohols incloent bioetanol i diferents productes químics base (etilè, propilè, butadiè, etc.) utilitzant processos catalitzats.

3.1.3.5. Green biorefineries

Les biorefineries verdes son sistemes que tracten les seves fraccions i productes d'acord amb la naturalesa de la seva biomassa.

La primera matèria que utilitzen pot provenir de diferents fonts, essent les més comunes prats anteriorment utilitzats per pasturar o bé de excedents de cereals encara verds. El primer que es fa es un refinament primari. Consta d'un fraccionament mecànic que separa la matèria vegetal en una fase sòlida, constituïda bàsicament per fibres, i en una fase líquida plena de nutrients (3). Per posar de manifest el gran potencial d'aquesta idea cal dir que els preus dels components per separat que conformen la herba oscil·la entre 700-800€ la tona mentre que el preu de la matèria primera vegetal és de 50-70€ tona. (8)



Il·lustració 6: Relació de substàncies que componen l'herba (8)

L'eix central d'una biorefineria d'aquest tipus és un processament mecànic on es trenca la matèria vegetal perquè les fibres puguin obtenir-se de forma més pura (contenint menys d'un 11% en proteïnes).

Els productes principals són proteïnes que s'usen per fer pinsos; fibres per materials de construcció, materials d'aïllament, testos, compostos biològics, material per empaquetar, primeres matèries per a biofuels i components solubles com ara aminoàcids, sucres, àcids orgànics i minerals. Aquests components solubles es concentren per usar-los com a primera matèria en fermentadors.

Aquest tipus de biorefineries estan funcionant a països d'Europa com ara Àustria, Alemanya o Irlanda i tenen com a objectiu la utilització total dels recursos i la reducció d'emissions a zero, usant tots els residus en plantes de biogàs per tal de ser energèticament autosuficients.

3.1.3.6. Biorefineries marines

La biomassa aquàtica disponible es similar a la terrestre. Tot i això, sempre s'ha utilitzat més la biomassa terrestre, deixant de banda les fonts marítimes com ara les microalgues i les macroalgues i els productes derivats que es poden produir a partir d'elles. Les algues, depenent de l'espècie i de les condicions de creixement, poden acumular un gran

quantitat d'olis, carbohidrats, midó i vitamines. Per exemple les microalgues verdes son riques en olis i midó i les dorades produeixen olis i carbohidrats. Recentment s'han reconegut com a font potencial de primeres matèries per a biofuels. Tot i així el cost de conrear i segar és encara massa elevat per fer-ne una opció viable per a fabricar combustibles i productes de gran demanda.

La següent taula explica de forma més gràfica els tipus de biorefineries existents actualment i ens dóna una mica de informació sobre quin tipus de productes poden oferir i el nivell de desenvolupament en el que es troba cada tipus.

Concept	Type of feedstock	technology	development	(selection)
Conventional biorefineries	Starch (corn, wheat, cassava) and sugar crops (sugarcane, sugar beet), wood	Pretreatment, chemical and enzymatic hydrolysis, catalysis, fermentation, fractionation, separation	Commercial	Sugar, starch, oil, dietary fibers, pulp and paper
Whole crop biorefineries	Whole crop (including straw) cereals such as rye, wheat and maize	Dry or wet milling, biochemical conversion	Pilot plant (and Demo)	Starch, ethanol, distiller's dried grains with solubles
Oleochemical biorefineries	Oil crops	Pretreatment, chemical catalysis, fractionation, separation	Pilot plant, Demo, commercial	Oil, glycerin, cattle feed
Lignocellulosic feedstock biorefineries	Lignocellulosic-rich biomass: e.g., straw, chaff, reed, miscanthus, wood	Pretreatment, chemical and enzymatic hydrolysis, catalysis, fermentation, separation	R&D/Pilot plant (EC), Demo (USA)	Cellulose, hemicelluloses, lignin
Green biorefineries	Wet biomass: green crops and leaves, such as grass, lucerne and clover, sugar beet leaf	Pretreatment, pressing, fractionation, separation, digestion	Pilot plant (and R&D)	Proteins, amino acids, lactic acid, fibers
Marine biorefineries	Aquatic biomass: microalgae and macroalgae (seaweed)	Cell disruption, product extraction and separation	R&D, pilot plant and Demo	Oils, carbohydrates, vitamins

Taula 1: Tipus de biorefineries (2)

3.1.4. Comparativa de les biorefineries amb la refineries petroquímiques

Actualment gràcies als productes amb base biològica s'arriben a generar entre 10 i 15 bilions de dollars americans dins de la indústria química global (2). Cada vegada més aquests productes guanyen en importància en front dels mateixos obtinguts per la via fòssil. Arribat al punt que oficialment estan descrits pel departament d'energia dels Estats Units els que ells consideren com els productes bàsics que han de ser els fonaments de la indústria bioquímica actual i futura, anomenats per la seva primera publicació del 2004 "the DOE "top 10" report" (9).

Compound	Criteria for inclusion
Ethanol	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Furans	<i>Furfural</i> : 1, 2, 7, 8, 9
	<i>HMF</i> : 1, 2, 5, 8 <i>FDCA</i> : 1, 4, 5
Glycerol and derivatives	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Biohydrocarbons	<i>Isoprene</i> : 1, 2, 3, 4, 6, 7
Lactic acid	<i>Biohydrocarbons</i> : 1, 2, 6 1, 2, 4, 7
Succinic acid	1, 2, 5, 6
Hydroxypropionic acid/aldehyde	1, 3, 4, 5
Levulinic acid	1, 2, 3, 5, 6, 8
Sorbitol	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
Xylitol	1, 2, 5, 8, 9

Taula 2: Llista revisada el 2010 del "DOE "top 10" report" amb els criteris continguts en el mateix (9)

A la *taula 3* es poden veure algunes de les similituds i diferències entre les refineries de petroli i les biorefineries: l'alimentació, els intermedis base, molècules a partir de les quals es sintetitzen la gran majoria de productes; les tecnologies emprades i els productes que es produeixen en cada tipus de refinaria.

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

Taula 3: Diferències generals entre una refinaria fòssil i una biorefinaria (2)

La principal diferència entre la biomassa i les primeres matèries fòssils és el contingut en oxigen. Així doncs les composicions CHO serien: 85-90% de C, 10-14% de H i entre 0-1,5% de O pel petroli; 76% de C, 13% de H i 11% de O per olis vegetals i grasses animals; i 50% de C, un 6% de H i fins a un 43% de O en el cas d'una biomassa lignocel·lulòsica.

Tot i això encara és atractiu en el panorama actual intentar integrar el que es pugui les refineries fòssils amb les noves biorefineries. Un exemple de la viabilitat d'aquesta interacció la trobem en el "green biodièsel", produït amplament a partir de la hidrogenació catalítica d'olis vegetals o grassa animal utilitzant hidrogen disponible en les mateixes refineries (Petrobras H-bio process o UOP/ENI process en són exemples).

Intermedis base, com ara els olis provinents de la biomassa o el syngas, són alguns dels exemples d'aquesta integració. En aquest dos casos es pot fer el posterior processament cap a recursos més valuosos en instal·lacions petroquímiques (processos de craqueig, hidrotractaments, gasificacions, etc.).

A més, les biorefineries són cada vegada més una font alternativa de recursos, com ara en el cas d'intermedis base C2, C3 o C4; fins la seva aparició només produïbles a partir de recursos fòssils com són el carbó, el petroli i al gas natural.

3.1.4.1. Intermedis base C2

Com a font de nutrients, en la biotecnologia s'acostuma a utilitzar la glucosa. Aquesta última a partir d'una fermentació alcohòlica es desintegra obtenint-se com a producte final principal **etanol**, intermedi base C2. Aquest bioetanol pot ser usat com a combustible o bé deshidratar-se amb un catalitzador ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{MgO}$ o zeolita) portant a l'**etilè**. Aquest etilè és una font alternativa de la que s'obté en la piròlisis, on s'aplica vapor d'aigua i altes temperatures a les fraccions lleugeres del petroli (GLP, nafta i gasoil).

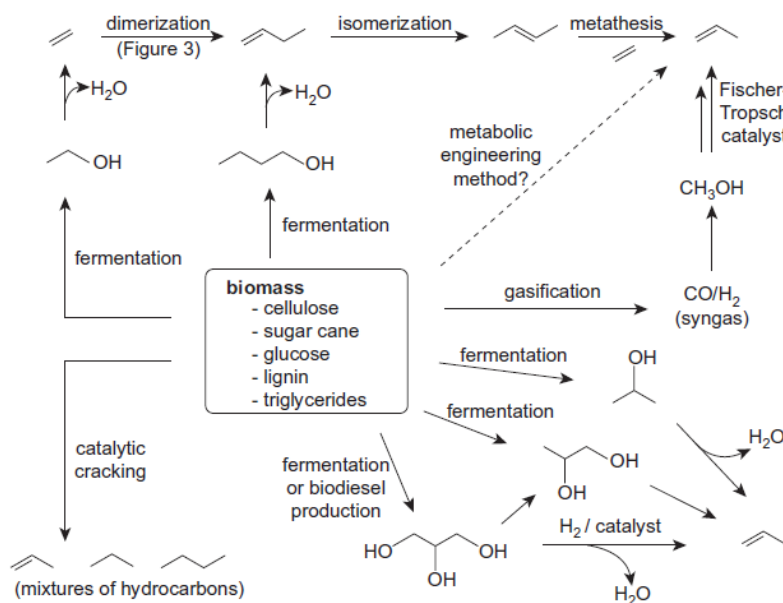
3.1.4.2. Intermedis base C3

L'obtenció d'aquests intermedis es pot fer mitjançant processos químics o bioquímics a partir de biomassa:

- En la producció de combustible per automòbils a partir olis vegetals i grasses animals també es forma **propà** com a coproducte.
- Un altre camí per obtenir **biopropilè** i **biopropà** passa per la deshidratació i hidrogenació del **glicerol**, obtingut per fermentació de la biomassa o en la producció de biodièsel com a subproducte.
- També és possible la gasificació de la biomassa per a produir syngas seguida de la sintetització de biometanol, i finalment algun procés de metanol cap a olefines (per exemple Fischer Tropsch) de cara a obtenir **biopropilè**.
- A partir de la fermentació de sucres per a produir bioetanol, deshidratant aquest a bioetilè, dimerització per a obtenir butens, i reacció de metàstasis amb bioetilè per a produir **propilè**.

Així doncs hi ha moltes maneres alternatives d'obtenir propilè, un dels intermedis químics de més demanda, a partir de fonts renovables. El propilè té un paper crucial en la producció de productes químics de tres àtoms de carboni i té un paper com a intermedi

en l'obtenció de productes molt diversos: explosius, cosmètics, polímers, dissolvents, resines, etc.



Il·lustració 7: Camins de síntesi a partir de la biomassa per a obtenir biopropilè (2)

Un altre producte químic base de tres carbonis és l'àcid làctic. És sintetizable per dos camins: fermentació de carbohidrats o conversió química a partir del glicerol. Aquest àcid ens porta a l'àcid acrílic mitjançant una deshidratació, pot ésser reduït a 1,2-propandiòl o pot usar-se també com a precursor del PLA (polylactic acid).

3.1.4.3. Intermedis base C4

Aquests intermedis són accessibles a partir de residus de blat de moro o canya de sucre com a primera matèria. Fermentacions anaeròbiques amb bacteris com el *Clostridium acetobutylicum* o el *Clostridium beijerincki* s'usen per a produir acetona i **butanol** o acetona, butanol i etanol (ABE, fermentació aceto-butílica-etílica) (10). Aquest últim és un procés que havia entrat en desús degut a la forma més econòmica de produir aquestes mateixes substàncies a partir de primeres matèries fòssils, però l'encariment del petroli i el pensament ecologista ha fet despertar-ne de nou l'interès.

Últimament s'han ideat tècniques de fermentació microbiològica amb *Escherichia coli* alterat genèticament per a produir alcohols de 4 o més carbonis a partir de la glucosa, per exemple 1-butanol, 2-metil-1-butanol i particularment **isobutanol**. Amb una deshidratació catalítica posterior del isobutanol es produeix una barreja de **olefines C4** (1-butè, cis-2-butè, trans-2-butè i isobutè) (2).

3.2. Teoria 2: Microorganismes i els seus processos fermentatius. Cinètica del creixement microbià.

Els primers usos de microorganismes per a la producció de productes d'interès daten de temps antics. Exemples d'aquesta afirmació els trobem en l'ús de llevats per produir pa i en la fermentació del vi o de la cervesa. Certament la comprensió dels mecanismes mitjançant els quals es produeixen aquests fenòmens és més recent, però l'ús d'aquestes tècniques per preservar aliments o per produir-ne de nous es desenvolupa des de l'antiguitat.

A part del menjar, també s'ha fet ús dels microorganismes per a fabricar productes químics i farmacèutics. En la Segona Guerra Mundial, degut a la necessitat d'utilitzar el petroli i altres matèries primeres per a fins bèl·lics, molts productes com ara la acetona, el glicerol o l'etanol eren produïts mitjançant fermentacions microbiològiques. Més tard, un cop acabat el conflicte i el preu del petroli baixà, aquestes metodologies perderen rellevància en front de mètodes petroquímics.

En els últims anys països emergents com ara la Xina o l'Índia han incrementat la seva demanda de petroli i derivats, això sumat al fet de que el petroli és una font no renovable i que s'està esgotant ha fet plantejar-se de nou mètodes fermentatius per a l'obtenció de productes que abans s'obtenien a partir de matèries primeres fòssils. Tampoc s'ha de menystenir l'efecte que té la combustió de fuels en el canvi climàtic com a font d'emissió de diòxid de carboni.

3.2.1. Microorganismes

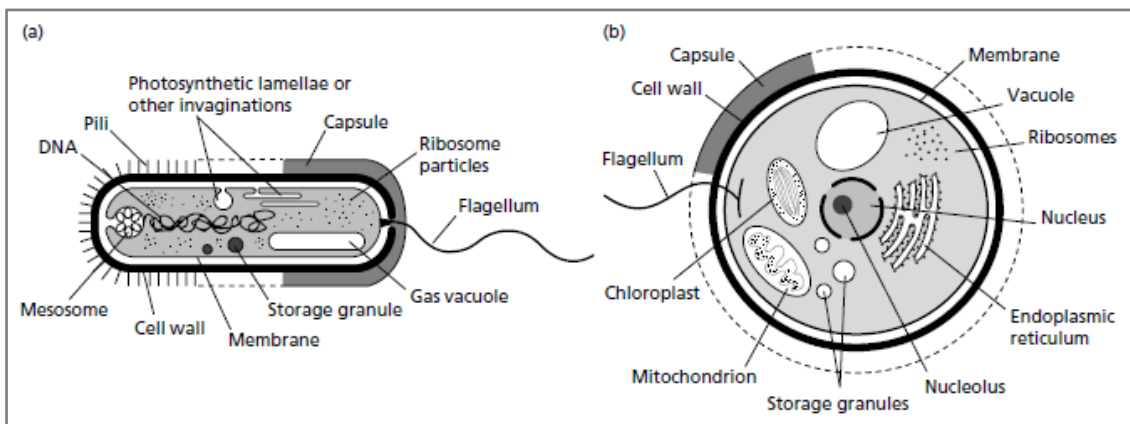
Químicament són semblants a la majoria de cèl·lules vegetals i animals i desenvolupen moltes de les mateixes reaccions. En general els microorganismes són unicel·lulars i requereixen menys nutrients que altres formes de vida més complexes.

La cèl·lula és la unitat bàsica de tot organisme viu i es divideixen en dos grups, procariotes i eucariotes:

- Procariotes: Comprèn els arqueobacteris i bacteris. Són cèl·lules de menys de $5\mu\text{m}$ de diàmetre amb algunes excepcions. No tenen nucli cel·lular i el seu material genètic es troba dispers en el citoplasma, reunit en una zona

anomenada nucleoide.

- Eucariotes: Comprèn fongs, protozous, algues i altres cèl·lules de plantes i animals. Acostumen a ser més grans que les procariotes i sí que tenen un nucli cel·lular diferenciat.



Il·lustració 8: Representació de a) una cèl·lula procariòtica i b) una cèl·lula eucariòtica (4)

Tot seguit es farà una petita referència als grups de microorganismes que tenen un cert interès industrial.

3.2.1.1. Arqueus

Els arqueus són bastant diferents dels bacteris i tenen certes característiques que els fan més semblants a les cèl·lules eucariòtiques. Molts viuen en condicions extremes i se'ls anomena extremòfils. Hi ha tres tipus fisiològics bàsics: halòfils (adaptats a altes concentracions de sal), metanògens (produeixen metà) i termòfils (adaptats a altes temperatures), i alguns d'aquests també són resistents a altes pressions. Són d'interès dos tipus més d'extremòfils: els acidòfils (resistents a condicions àcides) i els alcalífils (resistents a condicions bàsiques) (11).

Hi ha pocs arqueus que s'utilitzin en la indústria, tot i que cada vegada més estan prenent importància. Sobretot en el cas del arqueus extremòfils, que poden ser una font d'enzims que funcionen en aquestes condicions severes. Per altra banda els metanògens són una part vital del tractament de residus, són un dels microorganismes que duen a terme la digestió anaeròbica i produeixen biogàs.

3.2.1.2. Bacteris

També anomenats eubacteris són un grup molt variat dividit en 12 subgrups. Tot i això les industrialment rellevants estan contingudes en només 2: els protobacteris, formats per

bactèries gramnegatives; i els bacteris grampositius. Solen mesurar uns quants micròmetres de llargada i poden presentar diverses geometries. El nom prové del grec *baktērion* ("petit bastó"). Són presents en tot tipus d'hàbitats.

En destaca la capacitat de degradar determinada matèria orgànica, per aquesta raó s'ha utilitzat molt en el processament de residus o en la bioremediació, que es basa en la utilització d'agents biològics en medis contaminats. Hi ha alguns tipus de bacteris capaços de digerir hidrocarburs del petroli, amb les possibilitats que comporta.

Un altre ús important és en l'obtenció de productes químics enantiomèricament purs, com per exemple la producció biocatalítica del 4-cloro-3hidroxibutanoat (CHBE) un intermedi bàsic per a la producció de productes farmacèutics (12).

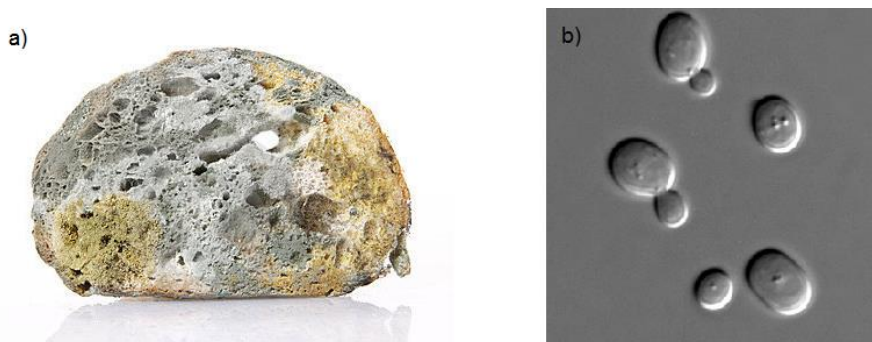
També en control bacteriològic de plagues s'utilitzen bacteris en comptes de pesticides, cas del bacteri *Bacillus thuringiensis*, un bacteri grampositiu que viu al sòl i que genera una protoxina que al ser consumida i digerida per l'insecte és quan fa efecte el principi actiu, a més són selectives afectant de manera específica a un determinat grup d'insectes (13).

Un altre ús clar, que és el que ens ocupa en aquest treball, és la seva participació activa en el funcionament dels fermentadors.

3.2.1.3. Fongs

Els fongs són un grup de microorganismes eucariotes que ocupen diferents hàbitats. La majoria d'espècies creixen en forma de filaments multicel·lulars anomenats hifes, els quals coneixem com floridures. Els llevats en canvi, també del regne fungi, són organismes unicel·lulars. Hi ha milers d'espècies conegudes de fongs filamentosos, però en són poques en comparació les que s'usen en la indústria.

Un cas de fong que requereix especial atenció són els llevats, essent important la seva contribució com a microorganisme d'ús industrial. En la fabricació de cervesa, de vi o de pa es fan servir llevats, concretament s'usa *el Saccharomyces cerevisiae*, un dels llevats històricament més utilitzat. Aquest mateix llevat avui en dia també s'utilitza en moltes altres fermentacions, com ara en la producció d'etanol com a combustible o de insulina per ús humà, entre d'altres (11).



Il·lustració 9: Dos exemples de l'ús de fongs al llarg de la història, a) el pa amb floridures s'utilitzà en diverses cultures com a font d'antibiòtics, i b) el llevat *S. cerevisiae* s'usa en moltes fermentacions actualment. (4)

També serveixen per a la bioremediació, en aquest cas s'usa el terme micoremediació, en el qual s'usen fongs per retenir agents contaminants presents en el medi.

Moltes espècies produeixen substàncies que són utilitzades en medicaments: la penicil·lina, antibiòtic que s'usa en el tractament de malalties infeccioses provocades per alguns bacteris sensibles a ella; la ciclosporina, un fàrmac immunosupressor que s'usa per evitar un possible rebuig en transplants d'òrgans, inicialment aïllat del fong *Tolypocladium inflatum* (14); l'àcid fusídic, derivat del fong *Fusidium coccineum* i que s'ha usat com antibiòtic contra el bacteri *Staphylococcus aureus*, resistent a la penicil·lina i la meticil·lina (15).

En la taula 4 s'observen arqueus, fongs i bacteris que tenen ús industrial.

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

Taula 4: Microbis amb ús industrial (11)

3.2.2. Perills associats amb l'ús industrial de microorganismes

S'ha de tenir en compte a l'hora de dissenyar qualsevol nou procés que abans de que comenci a operar s'haurà de passar una valoració dels riscos associats a la pràctica d'aquest. Sobretot en casos en els quals s'utilitzin GMMs (genetically modified microorganisms), que requeriran un anàlisi particular per a cada cas. En cas que es facin servir microbis coneguts aleshores n'hi haurà prou en classificar-los segons el risc que tinguin i actuar conseqüentment. La World Health Organization divideix el perill potencial dels microorganismes en 4 grups, essent el primer referent a aquells que no és probable que causin cap malaltia a persones o animals (*taula 5*). (11)

En casos que sigui requerit i depenent de la perillositat del microbi usat s'usen diferents nivells de barreres i conteniment. El **nivell 1** protegeix el personal i les instal·lacions immediates de qualsevol fuga, el **nivell 2** involucra l'ús de vestimenta especialitzada, supervisions mèdiques periòdiques i vacunació del personal. Ampliant el nivell 2 es pot arribar a plantejar un disseny específic de les instal·lacions destinades a albergar determinats patògens d'alta perillositat: ús de pressions negatives, filtres d'alta eficàcia, protocols a seguir, etc.

En casos de microorganismes de nivell de perillositat 1 només caldrà seguir bones pràctiques per grans sistemes (GILSP: *good industrial large-scale practises*).

Risk Group 1 (no or low individual and community risk)

A microorganism that is unlikely to cause human or animal disease.

Risk Group 2 (moderate individual risk, low community risk)

A pathogen that can cause human or animal disease but is unlikely to be a serious hazard to laboratory workers, the community, livestock or the environment. Laboratory exposures may cause serious infection, but effective treatment and preventive measures are available and the risk of spread of infection is limited.

Risk Group 3 (high individual risk, low community risk)

A pathogen that usually causes serious human or animal disease but does not ordinarily spread from one infected individual to another. Effective treatment and preventive measures are available.

Risk Group 4 (high individual and community risk)

A pathogen that usually causes serious human or animal disease and that can be readily transmitted from one individual to another, directly or indirectly. Effective treatment and preventive measures are not usually available.

Taula 5: Classificació de la World Health Organization dels microorganismes en base el perill que representen (16)

3.2.3. Necessitats nutritives dels microbis

Els microorganismes que s'utilitzen en les fermentacions i en aplicacions industrials en general tenen unes certes necessitats nutritives, un grapat de nutrients diferents segons el microorganisme que són necessaris per tal de créixer, reproduir-se i mantenir-se viu. Es pot veure en la *taula 5* un resum de les principals fonts d'energia, electrons/hidrogen i carboni utilitzats per cada organisme.

Com a font d'energia, els microbis poden classificar-se en **quimiòtrofs**, si obtenen energia de l'oxidació de compostos orgànics o inorgànics, al alliberar-se l'energia d'enllaç; o en **fotoòtrofs**, si l'energia s'obté en forma lluminosa.

L'obtenció d'hidrogen i d'electrons pot provenir de dues fonts diferents, els **organòtrofs** n'obtenen de compostos orgànics i els **litòtrofs** de compostos inorgànics.

Physiological type	Source of		
	Energy	Electrons	Carbon
Chemotroph	Chemical		
Phototroph	Light		
Organotroph		Organic compound	
Lithotroph		Inorganic molecule	
Autotroph			CO ₂
Heterotroph			Organic compounds
Chemoorgano (hetero) troph (animals, fungi, protozoa, many bacteria)	Organic compound	Organic compound	Organic compound
Chemolitho (auto) troph (some bacteria)	Inorganic molecule	Inorganic molecule	CO ₂
Photolitho (auto) troph (plants, most algae, some bacteria)	Light	Inorganic molecule	CO ₂
Photoorgano (hetero) troph (algae, some bacteria)	Light	Organic compound	Organic compound

Taula 6: classificació nutricional bàsica dels microorganismes (11)

Una tercera classificació fa referència al carboni, els organismes **autòtrofs** usen com a font primària o única CO₂ mentre que els **heteròtrofs** poden utilitzar diferents compostos orgànics com a font del mateix: hidrocarburs, lípids, àcids orgànics i polisacàrids.

Generalment quan s'opera a nivell industrial s'usen fermentacions heterotròfiques en lloc de autotròfiques, aleshores són requerides altes concentracions de les fonts de carboni, de 10-20 g/L o més. Com a font de carboni i d'energia generalment el que s'utilitzen són sucres, sobretot glucosa.

L'hidrogen i l'oxigen són també macronutrients, que poden ser obtinguts a partir de l'aigua o bé de compostos orgànics. El nitrogen, un altre macronutrient, és necessari per el correcte creixement, normalment es requereix una font que poden ser sals amòniques o nitrats entre d'altres, a concentracions de 1-2 g/L.

Hi ha altres substàncies que són requerides, encara que a menors concentracions: fòsfor, en concentracions menors a 100 mg/L; sofre, sovint en forma de sulfat o sal en concentracions de 20-30 mg/L; o altres com calci, ferro, potassi i magnesi, proveïts en petites quantitats, menys de 10-20 mg/L.

Finalment quantitats molt petites (0,1-1 mg/L) d'elements necessaris per alguns enzims, en quantitats tan escasses que no requereixen d'una font doncs ja són presents en l'aigua i altres ingredients: níquel, molibdè, seleni, zinc, coure, cobalt i magnesi. (11)

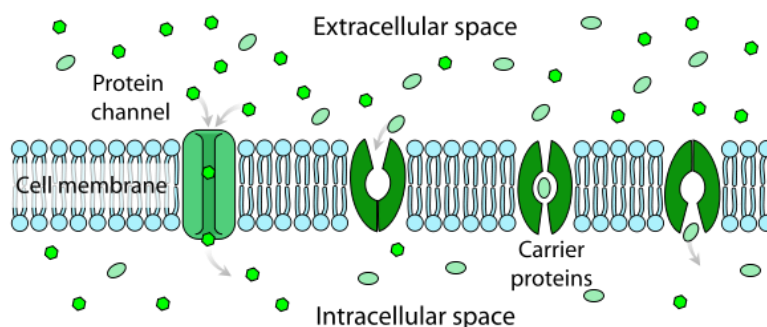
3.2.3.1. Absorció dels nutrients

Tots aquests nutrients es disposen en el medi on ha de dur-se terme la fermentació o el procés convenient, on s'ha de donar un transport d'aquests nutrients a través de la membrana cel·lular. La importància d'aquest punt rau en que acostuma a ser un pas que limita la conversió.

Aquesta absorció es pot donar per diferents mètodes.

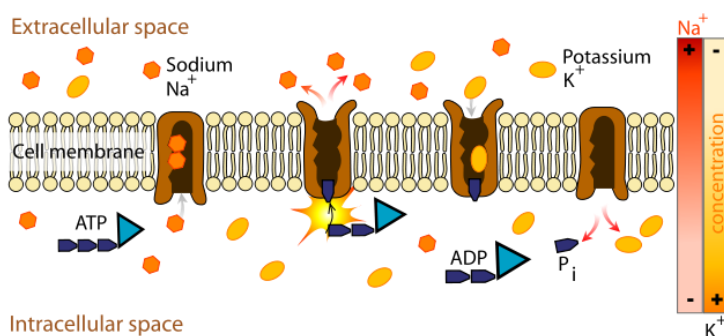
El primer és la **difusió passiva**, en nutrients solubles en lípids que poden travessar membranes hidrofòbiques (per exemple el glicerol i la urea). És un mecanisme ineficient, el grau d'absorció dependrà del gradient de concentracions a través de la membrana. Donat que la majoria de microorganismes habiten ambients amb baixes concentracions de nutrients, és necessari que puguin acumular soluts en contra del gradient.

Un altre mecanisme és la **difusió facilitada**. Aquest sistema involucra proteïnes transportadores. És el mecanisme d'absorció majoritari i no requereix d'una entrada extra d'energia. L'impulsor és el gradient de concentracions en la membrana i pot ser reversible. L'absorció no es veu frenada ja que tant bon punt entren els nutrients dins de la cèl·lula són metabolitzats, això implica que no hi hagi augments de la concentració intracel·lular.



Il·lustració 10: difusió facilitada en la membrana cel·lular, s'observen les proteïnes transportadores a la dret. (4)

També es poden donar **mètodes actius de transport**. Aquests sistemes permeten l'acumulació de les substàncies en contra de gradients de concentració, útil en ambients amb pocs nutrients. Aquest mecanisme requereix quantitats importants d'energia metabòlica, com la derivada del trifosfat d'adenosina, o bé algun gradient electroquímic. Igual que en la difusió facilitada també intervenen les proteïnes transportadores. (11)



Il·lustració 11: exemple de transport actiu: bomba de sodi-potassi. (4)

3.2.4. *Gluconobacter oxydans*

S'ha observat en diferents llibres i articles de revistes que a l'hora de dur a terme la oxidació del 2-metil-1,3-propandiòl per mitjà d'una fermentació microbiològica es poden utilitzar diferents microbis: *Acetobacter pasteurianus* (17), *Acetobacter ALEI* (18), *Gluconobacter oxydans* (1), *Gluconobacter roseus* (19).

Entre aquests s'ha acabat decidint que el que més convindria és el *Gluconobacter oxydans* (DSM 50049). Les raons que han portat a aquesta decisió són dues. Primer: que l'article en el qual es menciona l'ús de l'esmentada bactèria fa clara referència a la presència en determinats moments de l'intermedi 3-hidroxid-2-metilpropanal, el qual es vol aïllar juntament amb l'àcid 3-hidroxid-2-metilpropanoic. (1) Segon: que des d'un

primer moment s'ha volgut utilitzar una bactèria no patògena (20), en aquest cas és fins i tot comestible, tenint com té un rol important en la producció de vinagre (21).

Es un bacteri gramnegatiu que pertany a la família dels *Acetobacteraceae*. Està estretament relacionat amb l'anomenat *acetobacter*, els dos són classificats com bacteries de l'àcid acètic, però difereixen en el fet que mentre que el *gluconobacter* no és capaç d'oxidar ni l'etanol ni el lactat a CO_2 i H_2O mentre que en el cas de l'*acetobacter* sí que es dona aquesta reacció. La forma de les cèl·lules està descrita en nombrosa bibliografia, forma entre bastó i el·lipsoidal amb unes dimensions de 0.5-0.8 per 0.9-4.2 μm . És un bacteri que es pot trobar en diversos nínxols de sucre com ara en flors, en fruita madura, en les pomes, en el sòl del jardí, en ruscs d'abelles mel·líferes i en la cervesa i el vi. (20)

3.2.4.1. Efectes de les condicions en el cultiu

Els *gluconobacters* es caracteritzen per una respiració exclusivament aeròbica, per provocar l'acumulació de productes parcialment oxidats en el medi i per la incapacitat d'un ràpid creixement.

3.2.4.1.1. Font de carboni

Conté uns enzims anomenats deshidrogenases disposats en la membrana cel·lular, aquests permeten una ràpida deshidrogenació dels substrats de carboni, tot i això l'energia obtinguda per aquest processos no es suficient pel creixement cel·lular. Només es poden utilitzar glicerol o sorbitol com a base única de carboni (heteròtrof) (22) (1).

3.2.4.1.2. Necessitats nutritives dels *gluconobacters*

Com a font de nitrogen aquest tipus de bacteris poden usar amoníac únicament o bé alguns aminoàcids. Aquest organisme també requereix les vitamines B5, B3 i B10. L'adició d'alguns tipus d'aminoàcids estimula el creixement però no serveixen com a substitutiu de font de nitrogen (22).

3.2.4.1.3. Concentració d'oxigen dissolt

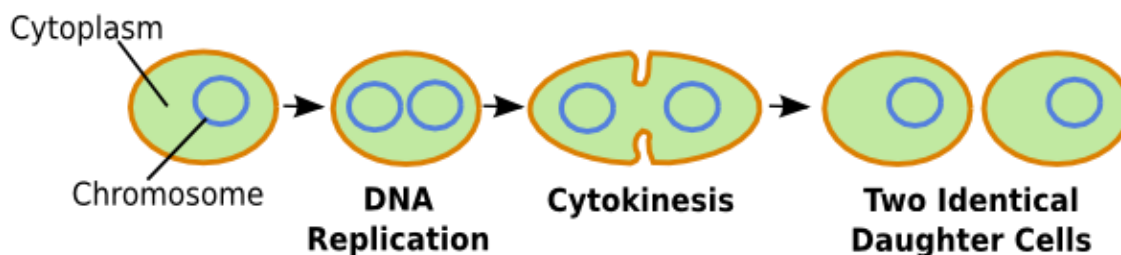
Són altament sensibles a la concentració d'oxigen dissolt (DO). L'augment de l'aeració estimula el creixement i les activitats oxidatives. Generalment els *Gluconobacter oxydans* porten a una oxidació incompleta dels alcohols, inclòs en presència d'un excés d'oxigen (20).

3.2.4.1.4. pH

El pH idoni pel correcte creixement d'aquest tipus de microbi està en l'interval 5.5-6. Es sap que aquest organisme és capaç de créixer en un pH de 3.5-8.0, i no ho pot fer en condicions normals en pH menors de 3.5-4.0, a menys que hi hagi un increment nutricional, tot i que ho fan en menor mesura (22) (23).

3.2.5. Cinètica del creixement microbià

El creixement microbià és la reproducció o divisió cel·lular d'un bacteri mitjançant una bipartició, que consisteix en la divisió d'una cèl·lula en dues isomorfes (mateixa mida i forma). A grans trets, el que això implica és un augment del nombre de cèl·lules, i per tant de bacteries.



Il·lustració 12: Passos de la bipartició o fissió binària (4)

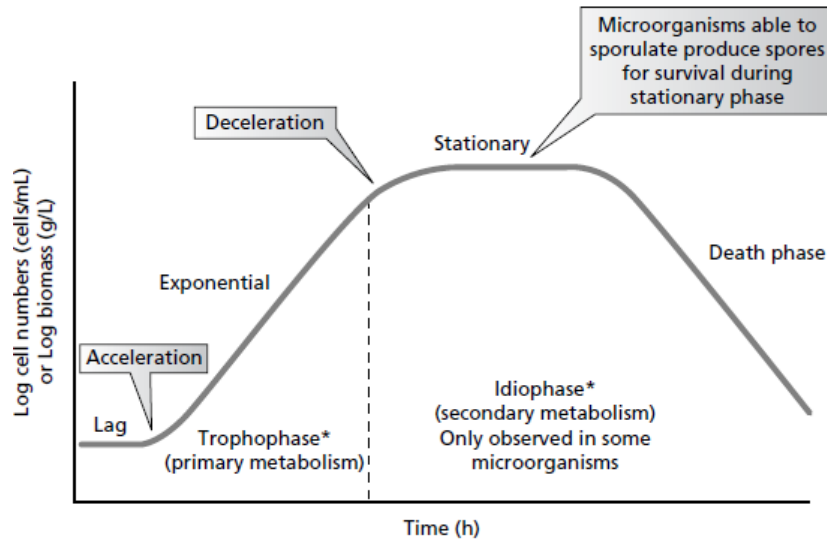
El procés de creixement dels microorganismes passa per diferents etapes. Comença per una **fase de latència**, un període d'adaptació on no hi ha creixement i que en qualsevol procés comercial interessarà escurçar al màxim; la següent és la coneguda com a **fase exponencial** i es caracteritza per iniciar-se amb un creixement gradual fins arribar a la velocitat màxima de creixement, que es manté constant durant aquesta fase. Es descriu per la següent equació:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Eq. 1}$$

Els significats són concentració d'organismes, **X**; temps, **t**; i velocitat específica de creixement, **μ** .

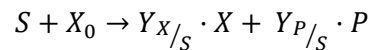
S'arriba a un punt aleshores on el substrat es va esgotant i això limita el creixement, entrant en la **fase de desacceleració**. A continuació es passa a una **fase estacionària** on el creixement bacterià ja no es possible perquè no queda substrat disponible. Aquesta fase dura més o menys depenent del microorganisme involucrat, certs processos

metabòlics possibiliten el manteniment però no es dona més creixement. Finalment es passa a la **fase de mort cel·lular**. (11) (24)



Il·lustració 13: Gràfica logarítmica del creixement microbià (11)

En el fermentador desenvolupat en aquest treball, la reacció principal pren la següent forma:



On **S** és el substrat, **X₀** la concentració inicial de bacteris, **X** la concentració de bacteris al cap d'un temps i **P** el producte format.

Al llarg de la història, s'han formulat diversos models matemàtics per tal de poder estudiar aquest tipus de reaccions: logística, logarítmica i Monod són alguns d'ells. El que més s'ha usat és l'últim, descrit per Jacques Monod el 1949, en el qual es defineix la relació entre la velocitat específica de creixement d'una població microbiana, μ [1/h], i la concentració de substrat, **S** [mg/L]. (25)

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Eq. 2}$$

La **K_s** és la constant de saturació, que és numèricament igual a la concentració del substrat quan $\mu = \mu_{max}/2$ [mg/L]. I μ_{max} és la velocitat específica de creixement màxima [1/h], assolida durant la fase exponencial.

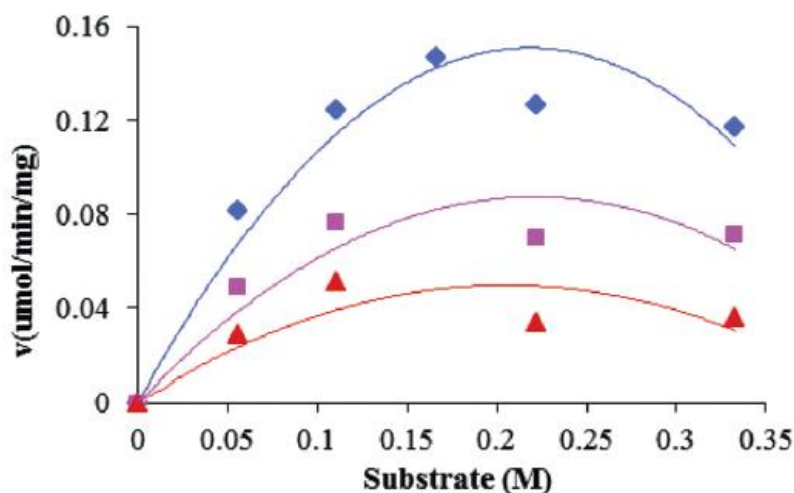
Observant que la Eq. 1 és igual a la velocitat de desaparició del substrat, canviada de signe, podem deixar la Eq. 2 en termes de velocitat de forma que:

$$r_{sub} = -\mu_{max} \cdot \frac{S \cdot X}{K_S + S} \quad Eq. 3$$

Hi ha una altra variable d'importància, un equivalent als coeficients estequiomètrics d'una reacció química convencional, el **coeficient de rendiment** (Y), que és el rendiment de biomassa produïda per substrat consumit [$g \cdot g^{-1}$]. Aleshores queda:

$$-r_{sub} = \frac{\mu_{max}}{Y} \cdot \frac{S \cdot X}{K_S + S} \quad Eq. 4$$

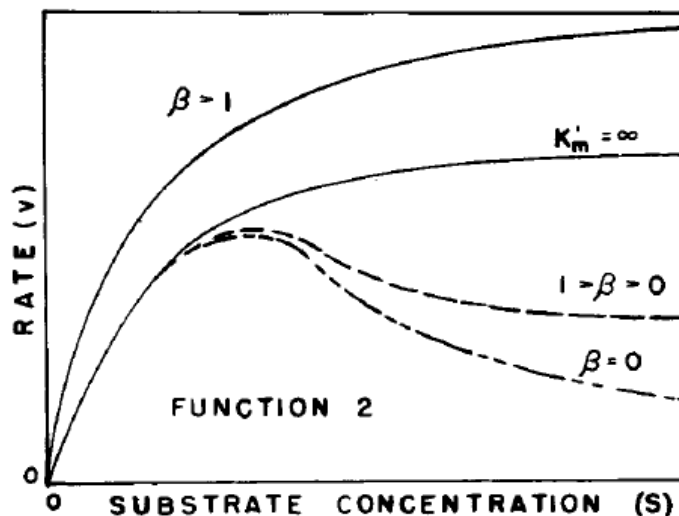
En el treball que ens ocupa, oxidació del 2-metil-1,3-propendiol pels *Gluconobacter oxydans* pot haver-hi una complicació (1). En l'article de Sang-Hyun Pyo, del 2012, s'esmenta una probable inhibició causada pel substrat al voltant de 0.2M.



Il·lustració 14: Gràfica de conversió versus concentració de substrat al variar la concentració bacteriana: 2.5 (blau), 5 (lila) i 10 (vermell). S'intueix inhibició pel substrat a 0.2M en totes les concentracions cel·lulars. (1)

En la gràfica s'observa una forma típica de compostos amb valor nutritiu per un cultiu de microorganismes. En concentracions petites, i si el nutrient és essencial pel creixement o altres processos metabòlics, el valor de la conversió pren valors baixos. En augmentar s'incrementaria igualment el valor de conversió degut a una estimulació del metabolisme dels microorganismes. S'arribaria a un punt en el qual un augment no afectaria a la conversió fins arribar a un valor en el qual l'augment de la concentració implicaria la disminució del paràmetre en qüestió, es a dir, la inhibició. (26)

Teòricament seria una gràfica d'aquest estil:



Il·lustració 15: Inhibició ($\beta < 1$) i activació ($\beta > 1$) causades pel substrat (26)

Així doncs degut a que sembla que sí que es dóna aquest tipus de inhibició, es pertinent descriure'n la cinètica.

Un model cinètic apte per a descriure el mecanisme és el següent, derivat d'un proposat per Haldane el 1930, i utilitzat per Boon Laudelout (26):

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{(K_s + S) \cdot (1 + S/K_i)} \quad \text{Eq. 5}$$

On el segon terme del denominador representa la inhibició. L'elecció del model es fa seguint les indicacions de Edwards, que en un anàlisi de diferents mecanismes per a casos on es donés inhibició del substrat determinà que és el model que descriu millor aquest fenomen. Tot i que altres models també són vàlids aquest és el més fàcil de manipular (26). Altres models vàlids són:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S + \left(\frac{S^2}{K_i}\right) \cdot \left(1 + \frac{S}{K}\right)}$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S \cdot \exp\left(-\frac{S}{K_i}\right)}{K_s + S}$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \exp\left(-\frac{S}{K_i}\right) - \exp\left(-\frac{S}{K_s}\right)$$

Models originaris o derivats de Yano, Aiba i Tessier, respectivament.

Parlant ara del model escollit per Edwards (Eq. 5), el passem a velocitat:

$$\frac{dX}{dt} = -r_{sub} = \frac{\mu_{max} \cdot S \cdot X}{(K_s + S) \cdot (1 + S/K_i)} \quad \text{Eq. 6}$$

De cara a resoldre aquesta equació, s'assumeix que la desaparició del substrat és directament proporcional a l'aparició de noves cèl·lules:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. 7}$$

Integrant aquesta equació amb unes condicions inicials (X_0, S_0) i assumint Y constant:

$$S = S_0 - (X - X_0)/Y \quad \text{Eq. 8}$$

Aïllant la X de l'equació 8, substituint-la en l'equació 6 i fent el pertinent canvi en el diferencial tenim la següent expressió que es pot integrar de cara a tenir una expressió més clara amb la que treballar.

$$\mu_{max} \int dt = - \int \frac{(K_s + S) \cdot (1 + \frac{S}{K_i})}{S \cdot (\frac{X_0}{Y} + S_0 - S)} dS \quad \text{Eq. 9}$$

Que després d'integrar-la amb condicions inicials (t_0, S_0):

$$\mu_{max} \cdot (t - t_0) = \left[\frac{\frac{K_s}{S_0}}{1 + \frac{X_0}{Y \cdot S_0}} \right] \cdot \ln \left[\frac{1 + \frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{S}{S_0}}{\left(\frac{S}{S_0}\right) \cdot \left(\frac{X_0}{Y \cdot S_0}\right)} \right] + \left[\frac{K_s + S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} + 1 \right] \cdot \ln \left[\frac{1 + \frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{S}{S_0}}{\frac{X_0}{Y \cdot S_0}} \right] + \left[\frac{S - S_0}{K_i} \right] \quad \text{Eq. 10}$$

Aquesta equació és útil per a analitzar sistemes de creixement microbià amb efectes d'inhibició del substrat. Fent ús d'aquesta equació podem predir els valors de la concentració del substrat en el temps, doncs encara que l'expressió es feixuga s'ha d'observar que t_0, S_0, X_0, K_s, K_i i Y són paràmetres dels quals se'n pot conèixer el valor, essent relativament senzill per mitjà de mètodes numèrics determinar el valor de S per un determinat temps.

Seguint passos semblants als seguits per arribar a l'equació 8 es pot arribar a expressar la creació de producte en funció del substrat quedant de la següent forma:

$$P = P_0 + Y_{P/S} \cdot (S_0 - S) \quad \text{Eq. 11}$$

Poden simplificar $P_0=0$, ja que en general no hi haurà producte a l'inici del procés.

Així doncs, aïllant la concentració del substrat, S , en funció de la concentració de bacteris, X , en l'equació 8 i la S en funció de la concentració de producte, P , en la equació 11 i substituint per cada cas les variables en la integral resolta (Eq. 10), es poden obtenir expressions semblants per estudiar les concentracions de bacteris i de producte:

$$\mu_{max} \cdot (t - t_0) = \left[\frac{\frac{K_s}{S_0}}{1 + \frac{X_0}{Y \cdot S_0}} \right] \cdot \ln \left[\frac{\frac{2 \frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{X}{Y \cdot S_0}}{\left(1 - \frac{X - X_0}{Y \cdot S_0}\right) \cdot \left(\frac{X_0}{Y \cdot S_0}\right)}}{\left[\frac{K_s + S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} + 1 \right]} \right] \cdot$$

$$\ln \left[\frac{\frac{2 \frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{X}{Y \cdot S_0}}{\frac{X_0}{Y \cdot S_0}}} \right] + \left[\frac{-(X - X_0)}{Y \cdot K_i} \right] \quad \text{Eq. 12}$$

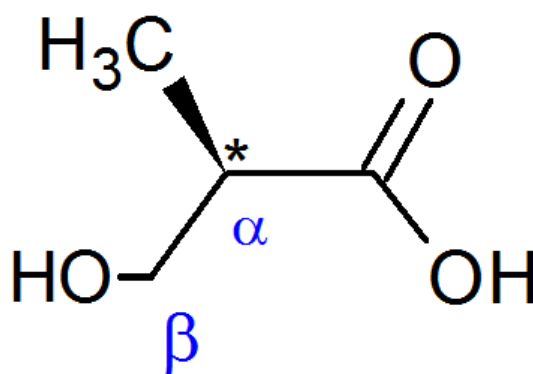
I pel producte:

$$\mu_{max} \cdot (t - t_0) = \left[\frac{\frac{K_s}{S_0}}{1 + \frac{X_0}{Y \cdot S_0}} \right] \cdot \ln \left[\frac{\frac{\frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{P}{S_0 \cdot Y_{P/S}}}{\left(1 - \frac{P}{Y_{P/S} \cdot S_0}\right) \cdot \left(\frac{X_0}{Y \cdot S_0}\right)}}{\left[\frac{K_s + S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} + 1 \right]} \right] \cdot$$

$$\ln \left[\frac{\frac{\frac{X_0}{Y \cdot S_0} - \frac{P}{S_0 \cdot Y_{P/S}}}{\frac{X_0}{Y \cdot S_0}}} \right] + \left[\frac{-P}{Y_{P/S} \cdot K_i} \right] \quad \text{Eq. 13}$$

3.3. Àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic. Estat de l'art i usos industrials.

L'àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic o àcid β -hidroxi-isobutíric (1) (18) és una molècula orgànica de 4 carbonis amb dos grups funcionals; un àcid carboxílic i un alcohol. Aquest àcid de fórmula molecular $C_4H_8O_3$ té una característica que el fa molt útil per a determinats usos, la quiralitat deguda al carboni asimètric.



Il·lustració 16: L'àcid 3-metil-1,3-hidroxiopropanoic o àcid β -hidroxi-isobutíric.

Aquest tipus de compostos químics, els àcids β -hidroxicarboxílics, són de gran importància i s'han usat per la elaboració de nombrosos productes químics. Així doncs, aquests compostos òpticament actius han estat utilitzats com a precursors per la síntesis de vitamines, additius alimentaris, antibiòtics i feromones (27). L'àcid β -hidroxi-isobutíric també és un important intermedi en la degradació enzimàtica de la valina en els mamífers (28).

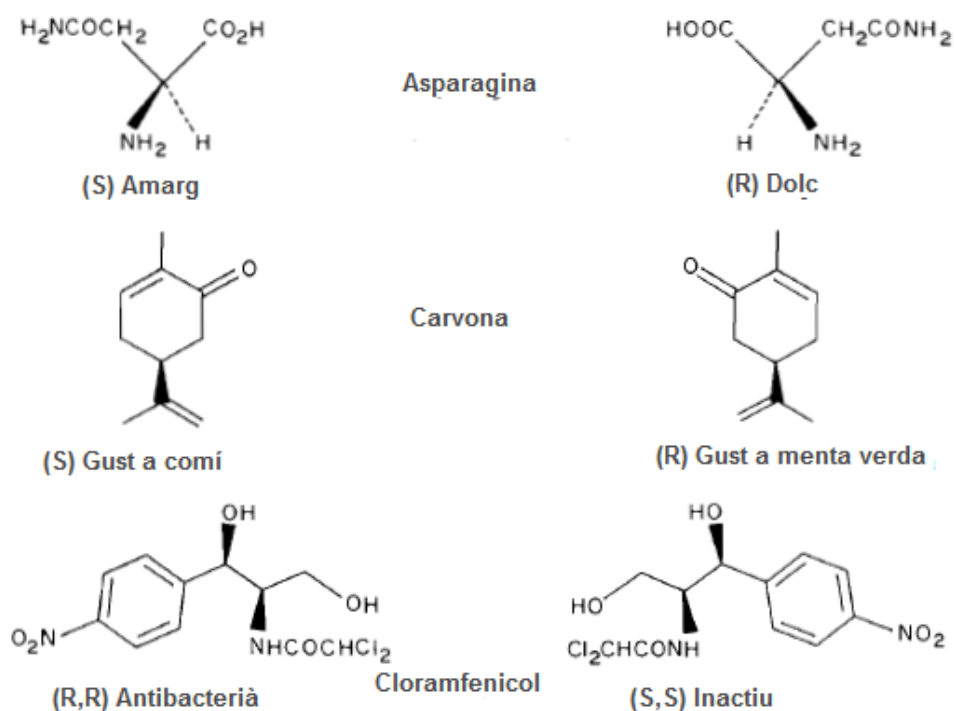
3.3.1. Importància de la quiralitat

Cada vegada més es volen productes enantiomèricament purs per a la producció de substàncies químiques. Tant en medicaments o en qualsevol substància relacionada amb la salut humana com en substàncies que combatin plagues i que podrien causar problemes en els aliments que després s'han de consumir, ens trobem amb productes que contenen com a mínim un centre quiral.

Hi ha moltes raons per això, algunes de les quals s'enumeren tot seguit:

- i. L'activitat biològica pot donar-se només en un dels enantiòmers.

- ii. L'activitat biològica pot ésser molt diferent depenent de l'enantiòmer. Produir-ne només un d'ells permet separar-ne els efectes. En la taula 6 hi ha alguns exemples.



Il·lustració 17: Propietats diferents en els enantiòmers. Modificada de la publicada en *Chiralty in Industry-An overview*. (27)

- iii. El compost òpticament pur pot arribar a presentar més de dues vegades l'activitat de la mescla racèmica. Això és per casos en els que hi ha un antagonisme entre els dos enantiòmers. És el cas d'una feromona sexual produïda per la femella de l'escarabat japonès, *Popilla japonica*, que s'ha identificat com l'enantiòmer R de la corresponent substància. Tant sols una presència del 1% de l'enantiòmer S redueix molt la resposta dels escarabats mascles a la feromona. (29)
- iv. També la regulació de cada país pot ser una motivació per obtenir compostos enantiomèricament purs. En determinats països on la quantitat d'impureses està regulada per llei és interessant obtenir només l'enantiòmer que presenta activitat, doncs l'enantiòmer inactiu és considerat un impuresa. (30)
- v. També s'ha de tenir en consideració l'oportunitat d'incrementar la capacitat d'un procés industrial al passar de la mescla racèmica a l'enantiòmer corresponent.

3.3.2. Obtenció de l'àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic

Hi ha molts camins citats en la bibliografia per tal d'obtenir aquest àcid. Existeixen tant mètodes químics com mètodes biològics basats en fermentacions, tot i que els darrers són molt més nombrosos, sobretot en els últims anys. Hi ha estudis que fan ús de fongs, altres de llevats o de bacteries o fins i tot bacteries mutants que proporcionin un rendiment major.

Tot i que en aquest treball estem partint d'un diol, el 2-metil-1,3-propandiol, que serà el precursor, i que teòricament l'estudi de l'obtenció d'aquest àcid es basa en el seu paper com a precursor en l'obtenció de metacrilat. En determinats articles s'utilitza aquest últim per a la producció d'un àcid amb molta importància en les farmacèutiques.

Un altre dels precursors habituals és l'àcid isobutíric el qual es metabolitza a l'àcid β -hidroxi-isobutíric.

3.3.2.1. Mètodes químics

Un dels mètodes més significatius, utilitzat des de fa molts anys és el descrit per Loring Coes Jr., la patent descriu un mètode mitjançant el qual obtenir àcid metacrílic, que després pot ésser hidrolitzat per obtenir l'àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic.

Utilitza com a matèries primeres metiletilcetona, que s'obté a partir del 2-butanol, que a la vegada s'obté en el cracking del petroli; formaldehid, lleixiu, àcid clorhídric i àcid sulfúric.

En un primer pas barreja metiletilcetona, formaldehid i hidròxid de sodi. Es refreda a -30°C i es deixa reposar 24 h per posteriorment destil·lar-lo i quedar-se amb la fracció que bull entre $90-120^{\circ}\text{C}$ a 20 mil·límetres de mercuri. Aquesta fracció és el β -metil- γ -oxobutanol.

En un segon pas usa el β -metil- γ -oxobutanol barrejat amb aigua per addicionar-lo a una solució de lleixiu comercial aigualida. Addició que es fa de manera gradual i barrejant la mescla durant dues hores a una temperatura d'entre 30 i 50°C . Posteriorment s'afegeix a aquesta mescla àcid clorhídric i s'escalfa a 75°C durant una hora.

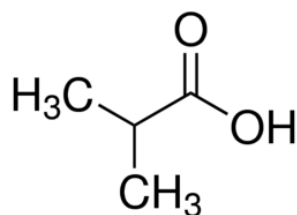
Aleshores s'extrau mitjançant dietilèter i aquest extracte es destil·la per eliminar l'èter, quedant l'àcid metacrílic juntament amb algunes impureses. Durant el segon pas es pot utilitzar coure o algun altre inhibidor per tal d'evitar la polimerització de l'àcid. (31)

Un altre procés per obtenir l'àcid β -hidroxi-isobutíric per mètodes químics és l'esmentat per Robinson el 1963 a partir de formaldehid i α -bromopropionat (32). O Choy que reporta la síntesis dels dos enantiòmers purs mitjançant una condensació aldòlica. (33)

3.3.2.2. Mètodes biològics

En els diferents articles que s'han consultat s'han usat distints precursors per obtenir l'àcid, els més habituals són l'àcid isobutíric i l'àcid metacrílic, però últimament també s'han publicat diversos articles en els que s'utilitza com a precursor el 2-metil-1,3-propandiòl, un producte molt econòmic disponible en el mercat com a subproducte en el procés d'obtenció del butandiòl mitjançant una reacció de hidroformilació d'un alcohol al·lílic i gas de síntesis, reacció senzilla i poc costosa.

3.3.2.2.1. Àcid isobutíric com a precursor



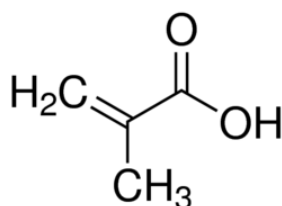
Il·lustració 18: Àcid isobutíric

Un dels mètodes d'obtenció de l'àcid, desenvolupat per Goodhue el 1971, utilitza la bactèria *Pseudomonas putida*. Aquest procés fermentatiu és dels primers en produir en grans quantitats l'enantiòmer L d'aquest àcid, essent una producció estereoespecífica. El procés es va donar en un fermentador d'acer inoxidable de 15 L de volum amb 4 bafles interiors. Es subministra aire per mitjà d'un difusor d'un sol forat disposat sota un agitador de 6 cares de tipus paddle instal·lat al fons. Hi ha un altre agitador per sobre la meitat del recipient. (34)

Un altre procediment que té com a precursor l'àcid isobutíric és el publicat el 1981 per Hasegawa. En aquest s'obté l'altre enantiòmer, el D- β -hidroxi-isobutíric, i s'utilitza el bacteri *Candida rugosa*. S'aconseguí una concentració de 21.7 g/l i una conversió del 50% (35). Lee i altres van millorar aquest procediment mitjançant un control suplementari de la glucosa en el qual s'anava afegint glucosa de forma controlada de forma que es mantingués la concentració d'aquesta en uns 10-20 g/l. En aquest cas s'obtingué una concentració molt major, 100 g/l, però amb una conversió del 40%. (36)

En un article del 1999, Kim i altres van dissenyar un procés per obtenir l'àcid mitjançant tres varietats mutants de la *Candida rugosa* (MME 1027, MME 1259, MME 1559). La idea estava en utilitzar certes bacteries mutades incapaces d'assimilar l'àcid propiònic i per tant que no portessin a una metabolització de l'àcid, i conseqüentment a una major conversió. L'estudi va concloure que la varietat MME1259 és la que dona uns millors resultats: 150 g/l i 81.8% de conversió. (37)

3.3.2.2.2. Àcid metacrílic com a precursor



Il·lustració 19: Àcid metacrílic

Un dels diferents estudis fets per tal d'obtenir D- β -hidroxi-isobutíric a partir de l'àcid metacrílic és el dut a terme per Lee el 1997. S'utilitzà *Candida rugosa* i un mutant d'aquesta bactèria. Els rendiments obtinguts després de 120 hores van ser de 65 g/l i 40% de conversió per la bactèria *Candida rugosa* i 70 g/l i 70% de conversió per la varietat mutant. (38)

En general s'ha vist que els organismes amb l'habilitat de produir àcid β -hidroxi-isobutíric a partir d'àcid isobutíric també són capaços de fer-ho a partir d'àcid metacrílic, però amb menor productivitat. En la taula 7 es veuen alguns exemples. (27)

Microorganism	Substrate	Cultivation period (h)	β -HIBA produced (mg ml ⁻¹)	Optical activity
<i>Candida rugosa</i> IFO 0750	IBA	27	7.3	(-)
	MA	44	4.1	(-)
<i>Candida rugosa</i> IFO 0591	IBA	27	8.1	(-)
	MA	44	3.6	(-)
<i>Pichia membranaefaciens</i> IFO 4258	IBA	44	3.2	(+)
	MA	44	1.5	(+)
<i>Trichosporon aculeatum</i> ATCC 22310	IBA	20	5.5	(+)
	MA	44	0.2	(+)
<i>Endomyces reessii</i> CBS 179.60	IBA	27	3.7	(+)
	MA	44	1.2	(+)

Taula 7: Diferents microorganismes que produeixen l'àcid β -hidroxi-isobutíric (β -HIBA) a partir d'àcid isobutíric (IBA) i d'àcid metacrílic (MA). (27)

3.3.2.2.3. 2-metil-1,3-propandiol com a precursor

En els últims temps degut al renovat interès cap a la producció sostenible s'han començat a investigar noves rutes per obtenir productes químics amb importància en la indústria. En aquest context s'investiga aquesta substància com a possible precursor per obtenir l'àcid 2-metil-3-hidroxi-propanoic, doncs l'esmentat diol és un subproducte econòmic i de gran disponibilitat.

Un dels primers treballs que se'n destaca data del 1979 i va ser dut a terme per Hiromichi Ohta i Hatsuki Tetsukawa que van utilitzar *Gluconobacter roseus*. (39)

Cal destacar en aquest apartat els treballs fets per Molinari. Dos articles publicats per ell i altres col·laboradors investiguen sobre les possibilitats que ofereix aquest camí. En un utilitzen com a bactèria una espècie anomenada *Acetobacter* ALEI i en l'altre utilitzen *Acetobacter pasteurianus*, essent les dues bactèries de l'àcid acètic. Aquest tipus de bactèries són eficients biocatalitzadors enantioselectius i poden provocar l'oxidació d'alcohols primaris i secundaris. A més com a característica addicional són completament inofensiu pels humans fins al punt de ser comestibles, amb el subsegüent abaratiment de les despeses en seguretat que això comporta. (18) (17)

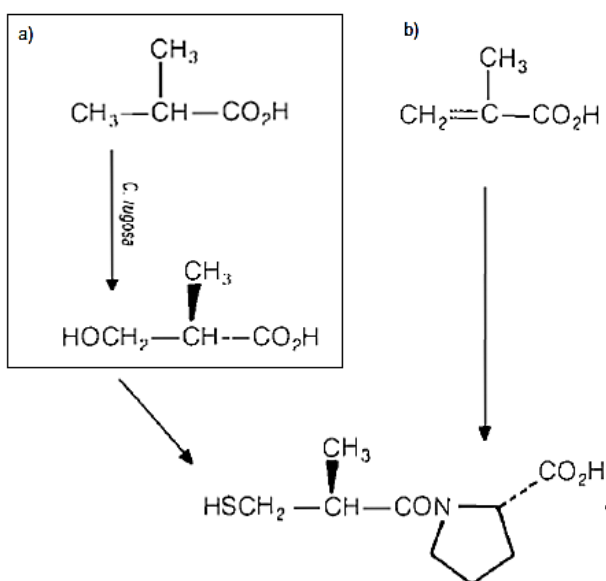
Els rendiments són una conversió del 85% i 29 g/l en el cas dels ALEI i gairebé un 100% i 25 g/l en el cas de l'*Acetobacter pasteurianus*.

En aquest treball ens fixarem més aviat en la publicació feta per Pyo el 2012. Utilitzant l'esmentat diol com a precursor en el procés fermentatiu i una bactèria de l'àcid acètic, els *Gluconobacter oxydans*, es dona una bioconversió passant pel 3-hidroxid-2-metilpropanal. El procés es va fer en un bioreactor a escala laboratori (3L) connectat a un microfiltre per recircular les bactèries. Es va mantenir l'agitació a 1000 rpm i un flux d'aire de 1 vvm. El pH va ser mantingut a 7.2 mitjançant l'addició de 5N NH₄OH i la temperatura a 28°C. (1)

3.3.3. Ús industrial de l'àcid β-hidroxi-isobutíric

La importància d'aquesta substància rau sobretot en la seva quiralitat, com s'ha explicat en l'apartat 3.3.2.1. Així, la demanda d'aquest tipus de substàncies és cada vegada major per les raons explicades en l'apartat referit. Sobretot en l'àmbit de les farmacèutiques, on com és lògic hi ha gran interès per maximitzar els efectes, en aquest cas mitjançant l'obtenció dels enantiòmers adequats que produeixen els efectes d'interès.

Un dels usos més valorats d'aquest àcid és en l'elaboració del Captopril, un fàrmac que provoca entre altres coses una vasodilatació dels vasos sanguinis, raó per la qual és àmpliament usat en la medicina: en casos d'hipertensió, després d'infarts de cor i per problemes de ronyó. Aquest fàrmac era preparat de tal forma que s'obtenia una mescla racèmica dels enantiòmers L i D. Es sap que l'enantiòmer D és fins a 100 vegades més efectiu que l'enantiòmer L, raó per la qual s'usava un procés anomenat *Chiral resolution* per tal d'aïllar l'enantiòmer corresponent. (40)



Il·lustració 1: Mètodes d'obtenció del Captopril. Molècules inicials [A, B] i producte final. a) proposat per Hasegawa i altres, b) mètode partint d'àcid metacrílic que conclou amb mescla racèmica. Simplificat de Chirality in Industry (27)

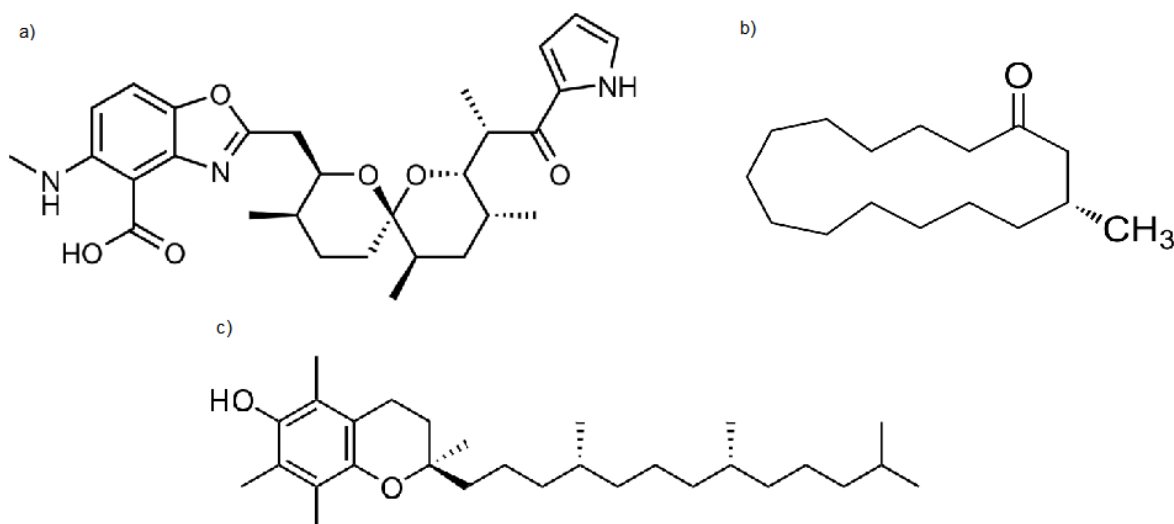
Hasegawa i altres investigadors van desenvolupar un mètode l'any 1982 mitjançant el qual s'obté directament la configuració desitjada a partir de l'àcid 3-hidroxi-2-D-metilpropanoic, doncs aquest té la mateixa configuració i la mateixa unitat de 4 carbonis que el Captopril (40). Mentre que el rendiment que s'obtenia després de separar l'enantiòmer de la mescla racèmica s'estimava en un 19%, amb el nou mètode proposat per Hasegawa s'arribava a un 65%. (27)

En el context de les farmacèutiques també té un ús en la síntesis del ionòfor Calcimycin, substància de propietats antibiòtiques que actua com a transportador de ions a través de la membrana cel·lular. (41)

Un altre ús és en la producció de α -tocoferol, una de les formes de la vitamina E i la més activa biològicament, que té funcions d'antioxidant i de regulador de l'activitat enzimàtica.

Tot i haver-hi ja mètodes per sintetitzar-la, Mayer i Isler el 1963, Scott i altres el 1976; Cohen fa ús de l'àcid com a molècula de partida per a produir l'esmentada vitamina. (42)

També te usos en la cosmètica, com en el cas de la síntesis de la muscona, substància utilitzada en perfumeria com a responsable de l'olor a mesc. La muscona natural s'obté del mesc, una secreció glandular del cérvol mesquer que s'ha usat durant milers d'anys. Però l'obtenció d'aquesta substància a partir del cérvol suposa matar un animal que està en perill d'extinció, raó per la qual actualment quasi tota la muscona emprada en la cosmètica ha estat sintetitzada a partir d'altres substàncies. Una ruta per obtenir-ne tant en la seva forma (R) com en la (S) és la proposada per Quirico Branca i Albert Fischli el 1977. Aquesta s'inicia amb una fermentació de l'àcid isobutíric a àcid (S)- β -hidroxisobutíric mitjançant el bacteri *Pseudomonas putida* (43).



Il·lustració 2: Compostos derivats de l'àcid β -hidroxisobutíric: a) Calcymicin; b) R-Muscona; c) α -tocoferol. Modificat d'imatges extretes del domini públic de Wikipedia (4)

Últimament s'ha proposat l'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic com a possible precursor de l'àcid metacrílic i el metacrilat de metil, dos monòmers de gran importància en l'elaboració de molts materials polimèrics. Aquest és l'ús que es tracta amb més importància en aquest treball, doncs suposa una alternativa al procés d'obtenció habitual d'aquests dos productes. El procés típic d'obtenció s'anomena procés de la cianhidrina de l'acetona (ACH, acetone-cyanohydrin) i utilitza unes primeres matèries altament tòxiques, així que és destacable l'aportació feta per diferents autors cap processos d'obtenció més sostenibles. (17) (18) (1)

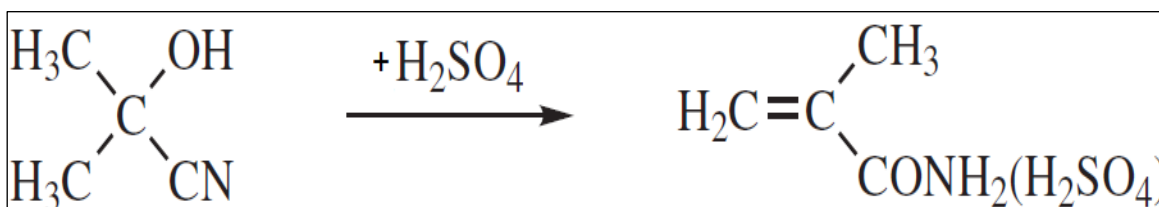
3.3.4. Àcid metacrílic i metacrilat de metil.

L'àcid metacrílic o àcid 2-metilpropenoic és un líquid incolor, moderadament volàtil i corrosiu, d'olor fortament acre. El metacrilat de metil és també un líquid incolor a temperatura ambient, i és el metil èster de l'àcid mencionat. Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior aquest dos compostos són monòmers de gran importància. El principal producte que se'n deriva és el polimetacrilat de metil (PMMA), amb un consum anual de 2.1 milions de tones. (1)

3.3.4.1. Procés d'obtenció

Aproximadament el 80% de la producció mundial del metacrilat de metil s'aconsegueix mitjançant l'esmentat procés ACH (1). També s'obté àcid metacrílic en aquest procés com a coproducte. El mètode es basa en la hidròlisis del sulfat de metacrilamida, obtinguda a partir de la cianhidrina de l'acetona. Per tal d'obtenir metacrilat de metil s'usa metanol en l'últim pas.

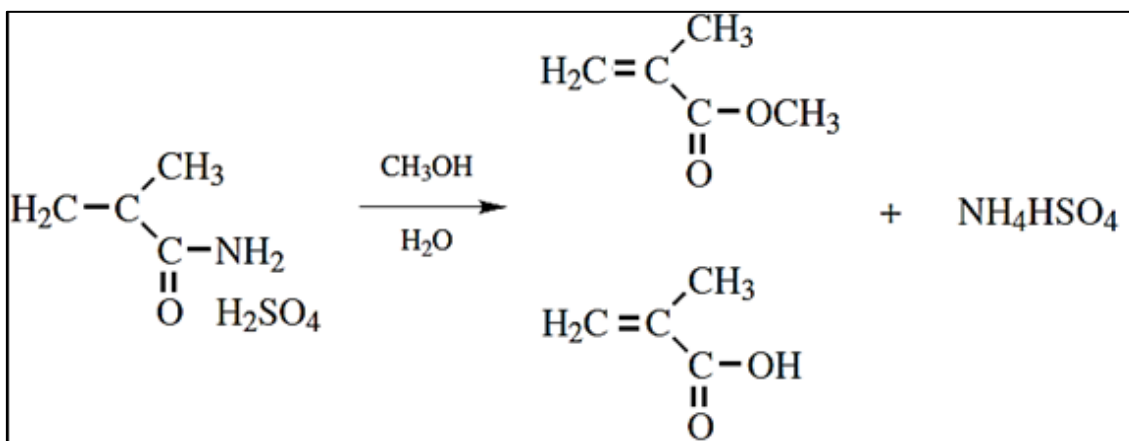
L'acetona i el cianur d'hidrogen reaccionen en medi bàsic per a donar la cianhidrina de l'acetona, que reacciona després amb un excés d'àcid sulfúric concentrat (1.4-1.8 mol per mol de cianhidrina) i forma sulfat de metacrilamida.



Il·lustració 20: Primer pas del procés ACH simplificat

Si no s'afegeix prou àcid es forma una massa sòlida o semisòlida difícil de refredar i bombejar. Tant l'àcid com la cianhidrina de l'acetona han de ser anhidres per tal de minimitzar la formació de α -hidroxilamida, que és més difícil de convertir a sulfat de metacrilamida.

En el següent pas de la reacció el sulfat de metacrilamida s'hidrolitza amb un excés d'aigua per donar àcid metacrílic i sulfat d'amoni. Aquest pas també pot fer-se mitjançant metanol aquós combinant un procés d'hidròlisis amb un d'esterificació per produir una mescla de metacrilat de metil i àcid metacrílic. (44) (45)



Il·lustració 21: Segon pas en el procés ACH per a obtenir una mescla d'àcid metacrílic i metacrilat de metil. Modificat de Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (45)

Aquest procés té certa problemàtica: utilitza primeres matèries altament tòxiques com ara el cianur d'hidrogen, es produeixen quantitats importants de subproductes, genera 1.5 tones de bisulfat d'amoni per cada una de metacrilat de metil i utilitza àcid sulfúric en grans quantitats, aproximadament 1.6 kg per cada un de metacrilat de metil. S'estima que aquest procés resulta en l'emissió de 5.5kg CO₂ per cada un de metacrilat i a més és un procés que es basa en el petroli i el gas com a primeres matèries (1). Mitsubishi Gas Chemical ha desenvolupat i patentat un mètode basat en aquest procés que no utilitza àcid sulfúric. (44)



Il·lustració 22: NFPA 704 del cianur d'hidrogen. Risc sever en salut i inflamabilitat. (4)

3.3.4.2. Reaccions

Tant l'àcid metacrílic com els seus èsters són molt reactius. Són possibles tant les reaccions típiques del grup vinil com les de l'àcid carboxílic o del grup èster. A més els grups carboxílic o èster polaritzen el doble enllaç i en milloren la reactivitat, tot i haver-hi un grup metil donador.

- Addició al doble enllaç portant a β-substituïts α-metil propionats.
- Reaccions Diels-Alder amb diens com el butadiè o ciclopentadiè per formar un sistema ciclohexè substituït.

- Reaccions del grup carboxílic com ara esterificacions i addició de olefines catalitzades per àcids.
- Oxidació del metil metacrilat per donar un peròxid polimèric que es descompon en formaldehid i piruvat de metil.
- Polimerització mitjançant escalfament en presència d'iniciadors com ara peròxids, UV o radiació ionitzant.

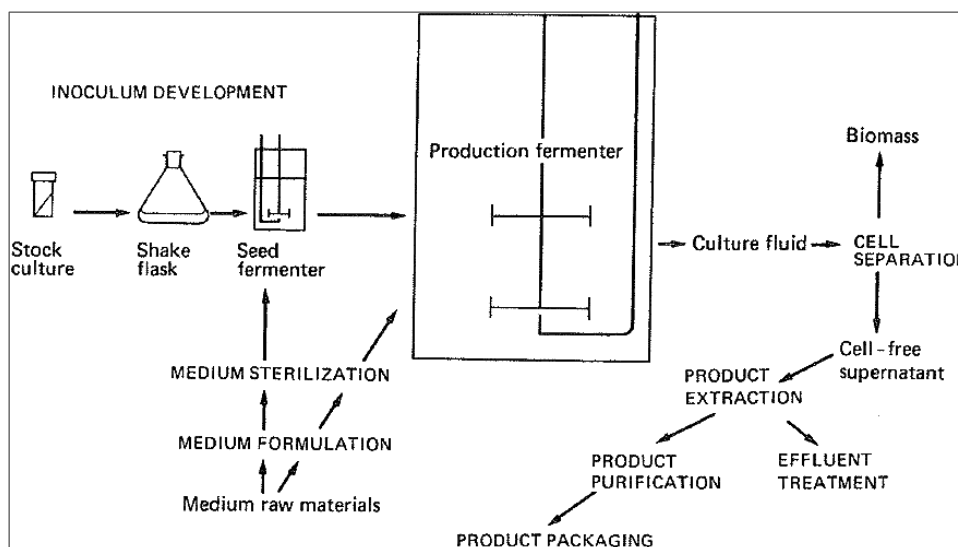
3.4. Fermentadors i bioreactors

El terme fermentació deriva del llatí *fevere*, bullir, i descriu l'acció dels llevats sobre el most o extractes d'altres fruites, de fet antigament s'usava el terme bullir per aquest procés. Aquesta relació amb bullir es va donar per l'aparença que provocaven les bombolles de diòxid de carboni provocades pel procés anaeròbic que es duia a terme en els sucres presents en l'extracte.

La fermentació és un procés metabòlic que converteix els sucres en àcids, gasos o alcohol. Aquest terme també s'usa de forma més general per referir-se al creixement massiu de microbis en un medi amb l'objectiu d'obtenir un producte químic d'interès. Hi ha casos de fermentacions de substrats sòlids però en general ocorren en fase líquida, en condicions anaeròbiques o aeròbiques.

En un context industrial aquest procés es dona en un bioreactor anomenat fermentador, un dispositiu on els microorganismes, bacteries o llevats, s'utilitzen per promoure la transformació bioquímica de la matèria. La funció principal d'aquests aparells és proveir un entorn idoni perquè l'organisme pugui produir el producte desitjat. L'actuació pot dependre de molts factors, alguns incontrolables, però hi ha una sèrie de paràmetres físics i químics clau i que s'han de controlar: temperatura, disponibilitat d'oxigen, el pH i l'espuma.

De forma general tot procés fermentatiu pot dividir-se en les següents parts: i) Formulació del medi, ii) esterilització del medi i l'equipament, iii) Producció d'un cultiu actiu per inocular el fermentador, iv) creixement de l'organisme i formació del producte, v) extracció del producte i purificació, vi) disposició dels efluents produïts. (24)



Il·lustració 23: Dibuix esquemàtic d'un procés fermentatiu (24)

Les fermentacions industrials comprenen tant la fermentació (upstream processing, USP) com la purificació del producte (downstream processing, DSP). El USP involucra tots els passos que acaben amb la fermentació en sí, i inclou aquesta. El DSP engloba tots els processos posteriors, destinats a la recuperació del producte. Depenent de l'ús final del producte es voldrà una puresa determinada. En el cas que ens ocupa per exemple, l'àcid β -hidroxi-isobutíric, no serà necessari el mateix grau de puresa si es vol usar per produir un fàrmac com ara el Captopril, requereix exclusivament l'enantiòmer D (40), que per a la producció d'àcid metacrílic per a fer polímers (1).

En aquest treball es vol dissenyar un fermentador per a produir àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic a partir d'un diol. Després de consultar diferent bibliografia s'ha observat que per aquest procés s'acostuma a utilitzar mètodes d'operació discontinus: Batch i Fed-Batch (18) (17), tot i que també hi ha algun cas que utilitzen un procés semicontinu (1). Cap al final d'aquesta secció s'espera que s'entendran aquests diferents mètodes de cara a que sigui més fàcil l'elecció d'un en el disseny.

3.4.1. Efectes dels paràmetres químics i físics

3.4.1.1. Temperatura

Teòricament a mesura que la temperatura puja la conversió de les reaccions químiques puja, aproximadament es dobla la conversió per cada augment de 10°C . Per tant, el creixement bacterià hauria d'augmentar quan la temperatura puja. Tot i això hi ha límits a partir dels quals certes macromolècules pateixen certs canvis i esdevenen no funcionals.

També hi ha un límit inferior pel correcte creixement bacterià, per sota del qual la membrana cel·lular no es suficientment fluida per funcionar correctament.

Hi ha una sèrie d'extremòfils, anomenades psicròfils, les quals són capaços de funcionar en temperatures anormalment baixes. Això passa perquè les seves membranes estan conformades per àcids grassos insaturats. Aquestes molècules es mantenen fluides a baixes temperatures, mentre que les membranes que contenen àcids grassos saturats es tornen no funcionals.

Hi ha un tipus de microorganismes també extremòfils que són anomenats termòfils, aquests poden arribar a funcionar per sobre de 50°C. L'exposició de microorganismes no-termòfils a aquestes temperatures causa danys a les membranes, desnaturalització irreversible dels enzims, trencament de les cadenes de l'ADN i trencament dels ribosomes, raons que porten a reduir el creixement, a la inhibició i a la mort cel·lular. (11)

3.4.1.2. pH

Els organismes acostumen a tenir un rang de 2-3 unitats en el qual és possible el creixement. Depenent del tipus de microorganisme poden ser: i) Acidòfils amb creixement a pH baixos, entre 1 i 5.5; ii) Neutròfils amb òptim de creixement a valors de pH neutre, els més comuns; i iii) Alcalífils amb bon funcionament a pH alts, al voltant de 10. Per tal de possibilitar aquesta adaptació als ambients aquests microbis són capaços de bombejar protons. En aquest cas s'està parlant del pH de l'entorn, és a dir al fermentador. El pH intracel·lular es troba proper a la neutralitat, ja que hi ha macromolècules sensibles als àcids i a les bases que es degradarien. (46)

3.4.1.3. Disponibilitat d'oxigen

Els microorganismes es poden classificar en cinc grups depenent dels requeriments d'oxigen:

1. Aeròbics: capaços de créixer en condicions atmosfèriques normals d'oxigen
2. Microaeròfils: Requereixen oxigen per determinats processos però només poden utilitzar-lo quan es troba a nivells inferiors al de l'aire (2-10%), degut a una capacitat limitada de respiració.
3. Aerobis facultatius: Poden créixer amb o sense oxigen.
4. Anaeròbics: No utilitzen l'oxigen. Els aerotolerants el toleren els Estrictes no el toleren, són inhibits o fins i tot moren.

L'oxigen és poc soluble en l'aigua i s'han d'usar sistemes per a tal de millorar-ne la solubilitat, doncs en cas de microorganismes que necessiten l'oxigen per la respiració aeròbica és necessari que aquest oxigen estigui dissolt. (46)

3.4.1.4. Espuma

La espuma és conseqüència de les proteïnes presents en el medi lligades a la interfase entre l'aire i el cultiu. Si no es controla la espuma generada en el fermentador es poden bloquejar els filtres, perdent-se les condicions asèptiques quan són necessàries. Pot arribar a passar que el fermentador es contamina per altres microorganismes que no hi haurien de ser presents.

3.4.2. Control dels paràmetres químics i físics

Tots aquests paràmetres i altres s'han de controlar per tal que la fermentació acompleixi els seus objectius. Per tal fi es duen a terme una sèrie d'accions de vegades mitjançant mecanismes, de vegades mitjançant l'addició de substàncies.

3.4.2.1. Agitació

L'agitació és dona per tal de mesclar les tres fases dins del fermentador. La fase líquida conté els nutrients, la fase gasosa és predominantment oxigen i diòxid de carboni i la fase sòlida està composta de les cèl·lules bacterianes i dels substrats sòlids en casos d'aquest tipus de fermentacions. La barreja produeix condicions homogènies i promou la transferència de nutrients, gas i calor. La transferència de calor és necessària durant la esterilització i durant l'operació, per mantenir la temperatura. És particularment necessària una bona agitació en casos de fermentacions aeròbiques, on els microbis només poden adquirir l'oxigen que està dissolt en la fase líquida: prolonga la retenció de les bombolles en suspensió, redueix la mida de les bombolles incrementant la superfície de contacte i disminueix el gruix de la capa de contacte de la interfase líquid-gas. (11) (24)

Hi ha tres mecanismes: tancs agitats, sistemes pneumàtics i mecanismes hidrodinàmics.

3.4.2.1.1. Tancs agitats (STR)

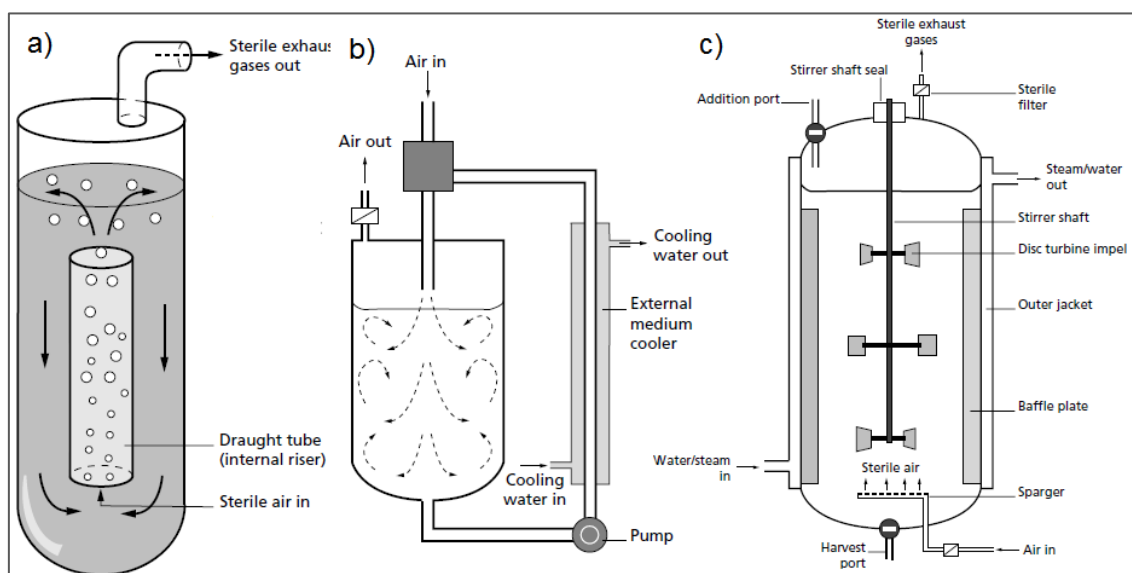
Moviment mecànic mitjançant agitadors o rodets dins d'un recipient cilíndric que habitualment conté deflectors (o bafles), superfícies planes verticals que serveixen per incrementar la turbulència, prevenint la formació de vòrtex i eliminant les "zones mortes".

3.4.2.1.2. Sistemes pneumàtics

Usen l'expansió de gas comprimit per dur a terme la mescla. Consumeixen menys energia que un STR i provoquen menys vibracions. S'inicia mitjançant la injecció d'aire comprimit a la part baixa d'un tub d'aspiració iniciant un moviment vertical cap amunt del líquid i iniciant un cicle de moviments en el fermentador. Cas del fermentadors airlift.

3.4.2.1.3. Mecanismes hidrodinàmics

Utilitzen energia cinètica del líquid per tal de moure el mateix. Això s'aconsegueix mitjançant una bomba exterior que recircula el líquid i el reinjecta de nou. Aquest sistema s'usa en fermentador de tipus deep-jet.



Il·lustració 24: Fermentadors amb diferents tipus d'agitacions: a) airlift, b) deep-jet, d) tanc agitad (11)

3.4.2.2. Transferència de calor

Una transferència de calor eficient és molt important pel control de la temperatura tant en l'esterilització com per mantenir la temperatura adequada durant la fermentació. La calor generada en una fermentació és deguda a l'activitat metabòlica primerament i als processos d'agitació mecànica. En general aquesta calor ha de ser dissipada mitjançant refredament. Contràriament, en fermentacions que operen a temperatures superiors a l'ambient, es requerirà un input de calor.

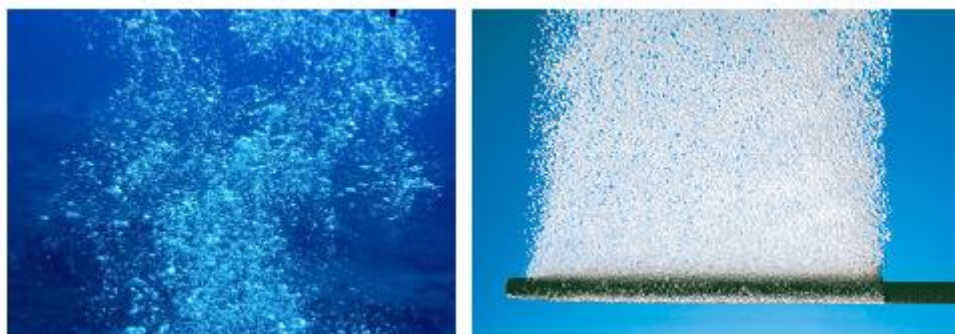
La transferència de calor s'aconsegueix normalment mitjançant el que s'anomena camisa escalfada o refrigerada, un bescanviador de calor que va per la part externa del

fermentador, o bé mitjançant un serpentí interior, en casos on es requereix un transferència major. En cap cas hi hauria contacte amb el medi, la calor es transporta pels mecanismes habituals a través de les parets, del serpentí o del recipient, i els deflactors. (11)

3.4.2.3. Transferència de massa

La transferència de nutrients des de la fase líquida a les cèl·lules bacterianes és relativament assequible ja que en general els nutrients estan disponibles en excés. Unes condicions idònies i una bona agitació són suficients per a garantir-ne la disposició. En canvi amb l'oxigen la cosa es complica, i algunes fermentacions es veuen limitades per aquest aspecte doncs l'oxigen es poc soluble en aigua (7-10 mg/L amb aire i fins a 40mg/L amb O₂ pur).

Tot i que hi ha fermentacions anaeròbiques, en general s'opera de forma aeròbica i es requereixen grans quantitats d'aire o oxigen que s'ha de dispersar de forma correcte. Per encarar aquest problema l'aire es distribueix en el fermentador mitjançant difusors de mida variable, depenent dels forats, i amb agitació o sense segons les necessitats. (11)



Il·lustració 25: Difusor amb agitació i sense (47)

Les necessitats d'aeració en una fermentació es pot determinar per un procés relativament simple.

3.4.2.3.1. Determinació de les necessitats d'aeració (46)

És necessari mantenir l'oxigen molecular en condicions òptimes per assegurar unes condicions de productivitat màximes. Els dos paràmetres relacionats amb la disponibilitat d'oxigen són la velocitat de transferència de l'oxigen de la fase gas a la fase líquida (**$k_L a$**) i la velocitat de consum d'oxigen per part del cultiu, **OUR** (oxygen uptake rate). (11)

La transferència d'oxigen en la mescla es pot explicar amb la següent fórmula, que depèn de la diferència de concentracions entre les fases i de la superfície de contacte entre el gas i el líquid.

$$N_{O_2} = k_L(C_{LI} - C_L) \quad \text{Eq. 13}$$

N_{O_2} és el flux d'oxigen [$\text{mg/s}\cdot\text{m}^2$], k_L el coeficient individual de transferència de matèria a la fase líquida [m/s], C_{LI} la concentració d'oxigen a la interfase [mg/m^3] i C_L la concentració d'oxigen a la fase líquida. Però les concentracions a la interfase són difícils de mesurar, així que s'acostuma a posar l'equació en funció del coeficient global i el gradient global de concentracions.

$$N'_{O_2} = K_L a(C_L^* - C_L) \quad \text{Eq. 14}$$

N'_{O_2} és el flux volumètric d'oxigen [$\text{mg/s}\cdot\text{m}^3$], $K_L a$ el coeficient global de transferència de matèria [m/s] que depèn del cabal d'aeració, la mida de les bombolles, la viscositat i altres paràmetres; C_L^* la concentració del líquid a la interfase i C_L la concentració del líquid. $K_L a$ s'ha de determinar en cada procés.

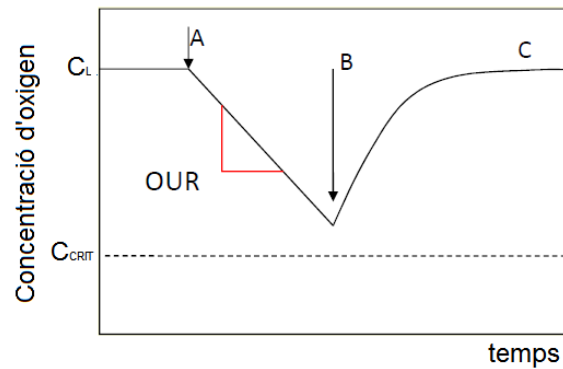
Per tal de de saber les condicions idònies necessitem també valorar les necessitats associades al consum biològic (**OUR**) a part de l'eficàcia de la transferència (**$K_L a$**). Fem un balanç de l'oxigen.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a(C_L^* - C_L) - OUR \quad \text{Eq.15}$$

On **OUR** és la velocitat específica de consum d'oxigen [$\text{mg O}_2/\text{m}^3\cdot\text{h}$]. I primer terme a la dreta de la igualtat és l'aportació de O_2 .

La **OUR** i la velocitat de transferència les podem determinar mitjançant una tècnica anomenada, mètode GAS IN-GAS OUT. Es basa en introduir una pertorbació en el sistema quan està en estat estacionari.

S'agafa el recipient on hi ha el cultiu i se'n mesura la concentració d'oxigen en temps zero, que correspondria amb la concentració de saturació. S'afegeix una petita quantitat de substrat en un temps i s'observa que la concentració baixa. Si s'afegís aire també es donaria aquesta situació, i al esgotar-se el substrat l'oxigen tornaria als nivells inicials. Si no hi hagués subministrament l'oxigen no augmentaria i es mantindria lineal en el temps.



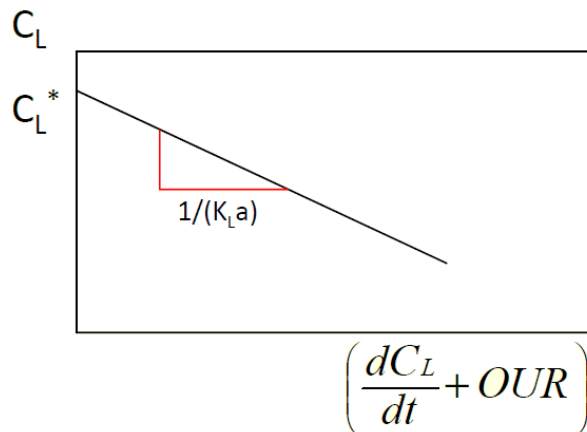
Il·lustració 26: A) S'atura l'aeració, B) Es reprèn l'aeració, C) Es manté l'aeració fins assolir la CO_2 inicial (46)

El pendent de la baixada és essencialment la velocitat global de consum del microorganisme (OUR) ja que canvi de concentració d'oxigen quan no estic airejant es degut exclusivament al consum d'oxigen per part dels microbis.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L) - OUR \quad \text{Eq.16}$$

Si es linealitzem el balanç d'oxigen $K_L a$ és la inversa del pendent. La funció és lineal de l'estil $y = m \cdot x + n$.

$$C_L = -\frac{1}{K_L a} \left(\frac{dC_L}{dt} + OUR \right) + C_L^* \quad \text{Eq. 17}$$



Il·lustració 27: Equació 17 graficada (46)

3.4.2.4. Addició de substàncies. pH i espuma

Per certs paràmetres no disposem de mecanismes que puguin mantenir-los en uns valors adequats pel correcte funcionament del fermentador. En aquestes situacions s'afegeixen substàncies que inhibeixen la formació o en mantenen el valor en un interval adequat.

3.4.2.4.1. Espuma

De cara a controlar la formació d'espuma es poden seguir tres camins: utilitzar una configuració mecànica en el fermentador que trenqui l'espuma, modificar la composició del medi o afegir productes antiespumants.

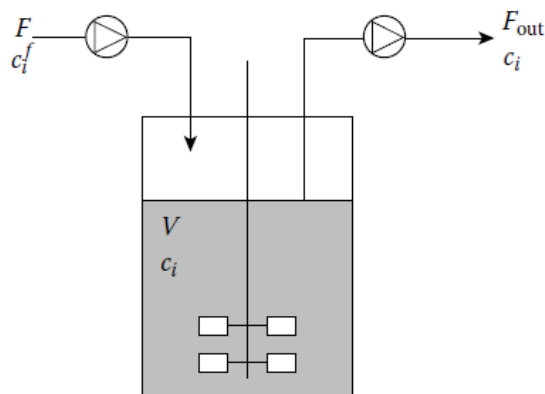
Aquests productes son agents superficials que redueixen la tensió superficial que manté l'espuma unida. L'antiespumant ideal hauria de respondre a les següents característiques: i) rapida dispersió, ii) activitat a poques concentracions, iii) acció prolongada, iv) no tòxic, v) econòmic, vi) termostable, i vii) compatible amb els altres components del medi. S'usen antiespumants naturals derivats d'olis vegetals o sintètics com polialcohols o glicols alquilats. (11)

3.4.2.4.2. pH

El control del pH s'acostuma a fer afegint substàncies, ja que a vegades els productes d'una fermentació poden alterar el pH. Normalment s'utilitzen dissolucions tampó, fosfats per exemple, però si la fermentació és llarga pot no ser suficient i es requereix afegir àcids o bases. Aleshores el pH es manté als nivells desitjats mitjançant una addició automàtica propulsada amb una bomba connectada a un recipient que conté l'àcid o la base, i un elèctrode que controli el pH. En casos de fermentacions que produeixen àcids també es pot usar hidròxid d'amoni, que també serveix com a font de nitrogen. (11) (24)

3.4.3. Mètodes d'operació i tipus de fermentadors

En general hi ha tres camins per dur a terme un procés de fermentació: procés continu, procés discontinu (Batch) i operació fed-batch, una modificació de l'últim. (48)



Il·lustració 3: Per continu ($F = F_{out} \neq 0$; volum constant), per Batch ($F = F_{out} = 0$; volum constant), per Fed-batch ($F \neq 0$ i $F_{out} = 0$; volum augmenta) (48)

3.4.3.1. Procés continu

És un sistema obert on s'hi afegeix contínuament el substrat i el producte es retira constantment també. D'aquesta forma es treballa contínuament. En aquests sistemes, els microbis creixen de forma exponencial durant períodes de temps llargs, amb un índex de creixement constant i especificat. A part, tenen la propietat d'assolir un estadi en el qual la concentració dels nutrients i el nombre de microbis no varia amb el temps. (11)

El creixement depèn d'un paràmetre anomenat velocitat de dilució, **D**, és el que en dona una idea de si s'està produint més o menys producte o consumint-se més o menys substrat. (46)

$$D = F/V \quad \text{Eq. 18}$$

Així doncs podem escriure un balanç de massa del reactor per cada espècie.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX \quad \text{Eq. 19}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \mu X + D(S_i - S) \quad \text{Eq. 20}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_P} \mu X - DP \quad \text{Eq. 21}$$

Donant la volta a l'equació 18 tindriem el temps de residència.

$$\tau = V/F \quad \text{Eq. 22}$$

Un aspecte interessant en aquest tipus d'operació és el seu estudi en estat estacionari. En el cas que $dX/dt=0$ implicarà que $\mu=D$, el que significa que podem regular el creixement del nostre cultiu (μ) regulant el volum (V) o el cabal (F). S'han de tenir en compte algunes consideracions:

- i) Es pot regular la μ fins un límit, $\mu_{\text{màx}}$, a partir de la qual les cèl·lules ja no creixeran, sinó que es produirà un rentat del bioreactor.
- ii) Si prenem el tipus Monod com a cinètica de creixement aleshores hem de tenir en compte que en la situació $D= \mu_{\text{màx}}$ l'equació ens donarà error, doncs serà una situació en que no tindrem substrat. Hem de tenir en compte que sempre hi haurà substrat en un procés continu.
- iii) La concentració de biomassa en el reactor en continu no varia, depèn del

rendiment o del substrat que entra menys el que surt. Per això quan fixem el cabal que entra o el volum, i per tant la velocitat de dilució D , tot el demés ens quedarà fixat. A cada D li corresponen una concentració de biomassa i de substrat úniques que quedaran fixades.

El que acaba interessant en aquest mode d'operació és acostar-nos a μ_{\max} però no sobrepassar-la, és a dir treballar per sota encara que no sigui el màxim creixement que les cèl·lules puguin tenir. Treballar molt a prop del valor màxim de creixement podria portar a que una petita variació aleatòria de les condicions provoqués el rentat del bioreactor. (46)

3.4.3.2. Procés discontinu (batch)

En un procés per lots hi ha certes condicions que són canviants, la concentració de nutrients, la concentració de productes i el creixement microbià. Les cèl·lules passen pels processos descrits en la il·lustració 13 de la secció 3.2.5. de manera que mai s'arriba a unes condicions d'estat estacionari. Els processos per lots típics segueixen els següents passos: i) carga del fermentador amb el medi de cultiu, ii) esterilització, iii) inoculació, iv) obtenció de productes microbians, v) separació de productes, vi) neteja del recipient. Això té certes repercussions econòmiques doncs durant bona part temps no s'està produint res. (11)

La cinètica de creixement microbià en un procés discontinu ha estat descrita en la secció 3.2.5.

3.4.3.3. Procés fed-batch

És pot considerar una variació d'un procés discontinu. Ha estat utilitzat per obtenir llevats alimentaris i penicil·lina. La diferència amb un procés discontinu està en que s'afegeixen nutrients un cop començada la fermentació, cosa que incrementa el volum de la fermentació.

Les addicions es poden fer de forma intermitent, afegint l'extra de nutrients en punts determinats i especificats, o bé afegir-los tan sols en un punt pel final de la fase de creixement. La raó està en estendre la producció, i és útil en casos en que els substrats presentin inhibició o bé en casos de substrats que es metabolitzen molt ràpidament. També és fa servir en fermentacions en que el substrat causa problemes relacionats amb la viscositat.

Aquesta operació és molt típica, ja que permet controlar molt bé les condicions mantenint certes substàncies als nivell desitjats i a la vegada permet altes concentracions en productes. Acostumen a haver-hi dos criteris per l'estratègia de l'alimentació:

1. Mantenir la concentració del substrat constant.
2. Mantenir el creixement volumètric dels organismes constants (o el consum d'un substrat).

S'aplica la primera en casos en que hi hagi inhibició de substrat, aleshores la concentració escollida serà dependent del grau d'inhibició conjuntament amb el desig de mantenir un cert creixement molecular. El creixement volumètric constant (o consum d'un substrat) s'aplica quan hi ha limitacions, com ara en el subministrament d'oxigen o en la dissipació de la calor. (48) (11) (24)

3.4.4. Esterilització

Per evitar la contaminació tant de la fermentació a causa de microbis aeris o de l'entorn a causa de productes de la fermentació, les entrades d'aire i les sortides incorporen filtres. Estan dissenyats per atrapar i contenir els microbis i estan fets de fibra de vidre, fibres minerals, politetrafluoroetilè o PVC. S'han de poder canviar i netejar fàcilment.

En situacions on s'usen microorganismes patògens, els sobrants de la fermentació podrien requerir utilitzar tècniques d'esterilització de calor seca, incineració. Aquesta tècnica es fa mitjançant forns d'aire calent a 160°C durant 2 hores.

En quan al fermentador també requereix esterilitzar-se, tant el recipient com el medi de cultiu. Per operacions a escala industrial o escala pilot aquesta esterilització es pot fer amb el recipient buit.

A escala petita, com en un laboratori, s'acostuma a omplir el fermentador amb medi de cultiu i posteriorment s'esterilitza amb vapor a pressió, normalment s'escalfa a una temperatura de 121°C durant 15 minuts. Per fermentadors més grans s'acostuma a usar temperatures més altes i més temps d'esterilització amb la intenció d'obtenir una probabilitat de contaminació menor al 0.1%. (11)

Una forma de conèixer les necessitats d'esterilització és a través de l'anomenat Del factor. Com més gran és el valor més grans seran les necessitats d'esterilització.

$$\nabla = \ln N_0 / N_t \quad \text{Eq. 23}$$

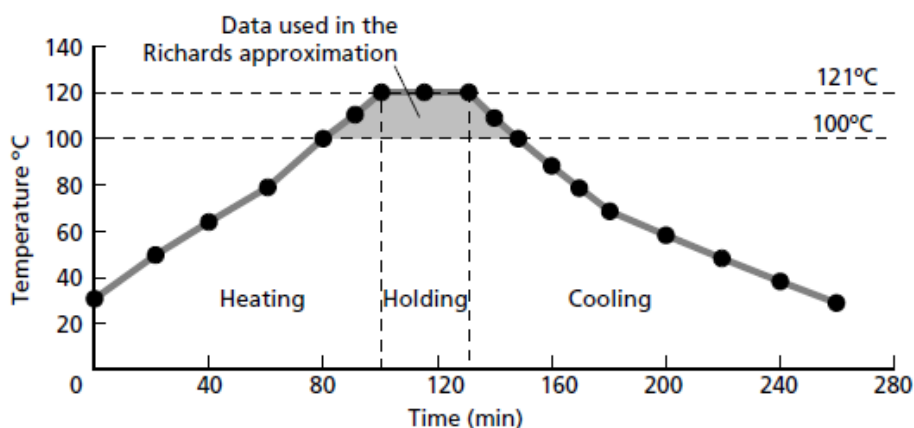
N_0 és el nombre de microorganismes que hi ha inicialment i N_t en representa el número al cap d'un temps t . El valor de N_t quan s'ha assolit l'objectiu d'un risc de contaminació del 0.1% és de 10^{-3} . El valor total del Del factor ve donat tant per l'escalfament com el refredament, a part es clar del temps que roman a la temperatura indicada.

$$\nabla_{total} = \nabla_{escalfament} + \nabla_{manteniment} + \nabla_{refredament} \quad \text{Eq. 24}$$

Si coneixem ∇_{escalf} i ∇_{refred} per un sistema determinat aleshores podem calcular el valor de ∇_{mant} sabent el valor de la constant de defunció del microorganisme (k).

$$t = \nabla/k \quad \text{Eq. 25}$$

Una simplificació del mètode és la que va fer Richards el 1968. Assumeix que tota la destrucció es dona quan la temperatura és superior a 100°C guanyant molta simplicitat i perden poca precisió. (24)



Il·lustració 29: esterilització d'un fermentador amb simplificació de Richards (11)

La metodologia per portar a terme l'esterilització és fer passar vapor a pressió per la jaqueta de refredament o pel serpentí interior, si n'hi ha. També es pot injectar directament a l'interior del recipient però pot haver-hi problemes per canvis de volum en el medi de cultiu. Aquesta metodologia, usant vapor, es més barata que utilitzant tècniques de calor seca, i és efectiva. (11)

A vegades hi ha components sensibles a la calor que poden destruir-se. En aquests casos s'acostumen a utilitzar sistemes d'esterilització per filtres. S'acostumen a utilitzar filtres absoluts o de porus fix, que es basen en porus menors a les partícules que s'han de retirar i son 100% eficients en remoure microorganismes. (24)

4. Materials i equips

Pel fet de que aquest es un treball teòric l'apartat de materials i equips no té molt de sentit, per bé que és un apartat present en el format oficial dels treballs de recerca de l'ETSEIB aleshores es menciona aquí que s'han usat diverses eines que són:

La biblioteca de l'ETSEIB així com el seu catàleg de revistes per tal d'accedir a certs continguts de revistes científiques i llibres de text de temàtica biotecnològica.

Continguts d'altre universitats com ara la Universitat de Barcelona per ampliar coneixements en àrees com ara la Biologia.

Cert programari de disseny per tal d'efectuar el disseny en tres dimensions del bioreactor que era l'objectiu d'aquest treball. El programari utilitzat ha estat Solidworks® pel disseny del fermentador en tres dimensions i eDrawings® per tal de passar aquest disseny a tres dimensions a un en dues i poder fer els plànols que revelen les geometries utilitzades en el model.

Certes pàgines d'accés gratuït a internet, per exemple Wikipedia, per tal d'aclarir conceptes i entendre punts específics, si bé s'ha intentat no utilitzar-les com a fonts principals d'informació per no considerar-les del tot fiables, al ser pàgines modificables sense una posterior revisió com sí que passa amb els articles i llibres de text utilitzats com a referències principals.

5. Resultats

Finalment de totes les investigacions publicades sobre la oxidació microbiana del 2-metil-1,3-propandiol que s'han trobat ens hem acabat decidint per seguir les indicacions de Sang-Hyun Pyo (1).

A continuació destaquem les característiques més rellevants d'aquest estudi:

CULTIU	Glucosa, llevats, CaCO ₃ , agar-agar, propilenglicol (antiespumant)		
SUBSTRAT	2-metil-1,3-propandiol		7.5 g/L
BACTERIA	<i>Gluconobacter oxydans</i>		2.6 mg/mL
CONDICIONS	AGITACIÓ		1000 rpm
	AERACIÓ		1 vvm
	pH		7.2 afegint NH ₄ OH
	TEMPERATURA		28°C
PRODUCCIÓ		3H2MPA ¹	4.21 g/L
	A les 3h	3H2MPAL ¹	0.46 g/L
		2M1,3PD ¹	2.83 g/L
		3H2MPA ¹	6.6 g/L
	A les 8h	3H2MPAL ¹	0.15 g/L
		2M1,3PD ¹	0.675 g/L

Taula 8: Característiques de l'estudi publicat per Sang-Hyun Pyo per l'oxidació del 2-metil-1,3-propandiol per acció dels *Gluconobacter Oxydans*.

¹ Abreviacions utilitzades: àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic (3H2MPA); 2-metil-3-hidroxipropanal (3H2MPAL); 2-metil-1,3-propandiol (2M1,3PD).

Sobre aquesta temàtica hi ha diferents estudis: Ohta (1982) utilitzava *Gluconobacter roseus*, León (2001, 2002) utilitzava una altra bactèria de l'àcid acètic anomenada *Acetobacter ALEI* i Molinari (2003) utilitzava *Acetobacter pasteurianus*.

La decisió s'ha pres al considerar l'estudi de Sang-Hyun Pyo totalment encarat a la producció de l'àcid metacrílic i el metacrilat de metil, productes de gran importància en la indústria dels plàstics i que històricament s'han produït per vies que utilitzen substàncies altament tòxiques i que produeixen grans quantitats de subproductes.

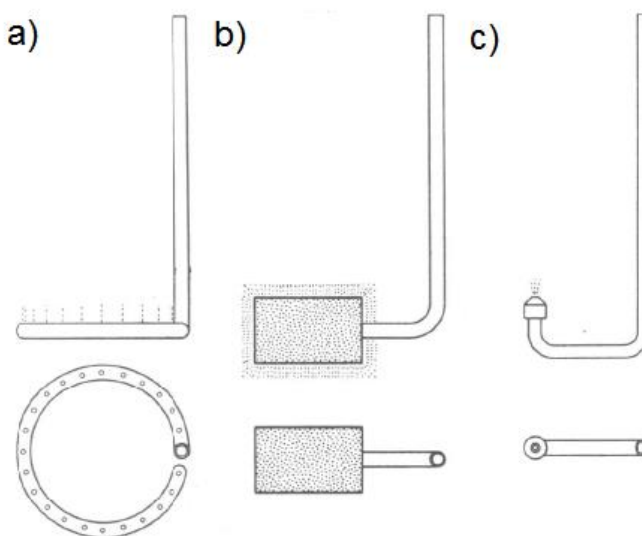
Després d'un estudi dels diferents articles i llibres de text, referenciats en la bibliografia d'aquest treball, que parlen d'aquest procés en concret i de les reaccions microbianes en general, s'han observat que sempre hi ha una sèrie de factors determinants i s'han hagut de decidir certs aspectes dels mateixos.

5.1. Condicions de la fermentació

5.1.1. Subministrament d'oxigen

La fermentació estudiada en aquest treball és una fermentació aeròbica, és a dir que requereix d'oxigen dissolt en el medi líquid per tal de produir-se.

De Ley i Kersters mencionen en un estudi de l'oxidació de glicols per bactèries d'àcid acètic la necessitat de una aeració excessiva si es volen obtenir bons rendiments, és necessari una bona dispersió d'aire estèril per aquest fi. (49)



Il·lustració 30: Sistemes d'aeració: a) anell ruixador, b) pedra porosa, c) orifici únic (50)

Aquest oxigen requereix d'algun sistema d'aeració per tal de distribuir-se correctament en el medi, i per tal efecte s'ha investigat en les opcions disponibles per ajudar-nos a decidir sobre quin era la millor opció. En un estudi de l'aeració publicat per Chain i altres col·laboradors (50) es fa una comparativa de diferents sistemes d'aeració (Il·lustració 22).

Es comparen diferents sistemes com un anell ruixador, una pedra porosa o bé un sistema d'un sol orifici. Els resultats obtinguts ens donen a entendre que el millor sistema per a obtenir una bona aeració podria ser una pedra porosa, però s'ha de pensar en la dificultat de neteja d'aquesta per la facilitat dels microorganismes en bloquejar-ne els porus, així que la decisió s'ha decantat cap a un anell ruixador de diàmetre igual a l'agitador que en condicions d'agitació respon com el millor sistema d'aeració (50).

En l'article publicat el 2003 per Molinari (17) s'usa una aeració de 1.5 vvm, tot i això aquest fa ús d'una altra bactèria de la mateixa família que els *G. oxydans*. En el publicat el 2012 per Sang-Hyun Pyo (1) l'aeració escollida va ser de 1 vvm. Aquesta última serà la que prendrem com a referència en el nostre bioreactor doncs és l'únic estudi que fa ús de la bactèria que ens interessa.

Escollides aquestes condicions el sistema escollit per la dispersió d'oxigen en el fermentador serà el distribuït per MOTT, biofermentation sparger de metall porós. (51)



Il·lustració 31: Mott biofermentation porous metal sparger

5.1.2. Temperatura

Un altre punt important en qualsevol procés microbià és la temperatura. Ja s'ha explicat que cada organisme té un rang de temperatures en les quals el seu comportament és òptim i que en el cas dels *Gluconobacter oxydans* aquest interval és entre els 25-30°C (20). A partir de 37°C ja no hi ha creixement i no es podrà treballar. (22)

En el moment de l'esterilització serà necessari assolir una temperatura de 121°C, però per aquest exercici s'usarà vapor a aquesta temperatura directament injectat al fermentador, de manera que no es requerirà d'un sistema de calefacció per aquest efecte.

Per aquest apartat s'ha considerat la necessitat d'implementar algun sistema de control de la temperatura, tenint en compte les característiques del fermentador dissenyat (altura, disposició de l'agitador i del difusor d'aire) s'ha decidit que un component vàlid seria el comercialitzat per Flowers Blossoming1105, una sonda de 300 mm en contacte amb el líquid. Funciona de -50°C a 1200°C.



Il·lustració 32: sonda per mesurar la temperatura de l'empresa Flowers Blossoming1105.

Un altre cosa que s'ha considerat és la instal·lació d'algun intercanviador de calor o camisa tèrmica. Aquest tipus de dispositiu s'instal·la a la cara exterior del fermentador i són útils per fermentacions llargues, doncs en ambients en els quals la temperatura és de 20°C és requereix introduir calor.

En el nostre cas tenim una fermentació de 8h, per tant senzillament introduïrem el substrat a una temperatura una mica major que a la òptima i farem ús d'un aïllant. L'aïllant escollit serà el produït per Isover Saint Gobain, PV Acustiver™. És un aïllant fet de fibra de vidre, un material econòmic que té una conductivitat tèrmica de 0.038 W/m·K.

La disponibilitat d'aquest juntament amb la facilitat d'instal·lació al ser una material flexible comercialitzat en forma de rotlle ha fet que passi pel davant de el poliestirè expandit. Aquest, tot i ser molt econòmic, al ser un material rígid seria més difícil d'aplicar i s'hauria de comprar fet a mida, de manera que s'encariria molt.



Il·lustració 33: PV Acustiver de Isover Saint Gobain

5.1.3. pH

La fermentació que es durà a terme en el bioreactor es donarà a un pH de 7.2 igual que en l'estudi de Sang-Hyun Pyo (1). Tot i això altres autors han fet la mateixa bioconversió a un pH de 6, si bé amb altres organismes (17) (18). El que si que és comú és que al llarg de la fermentació el pH tendeixi a baixar. Això passa ja que a mesura que passa el temps es va produint àcid de forma que es requerirà un sistema de control i actuació del pH.

S'ha dissenyat la tapa del fermentador amb dues obertures, una per a que hi càpiga una sonda i l'altre, més gran, per possibilitar l'afegiment de base. La substància que s'afegirà serà la mateixa que en l'estudi, NH_4OH 5M.

Pel control del pH durant la fermentació s'ha escollit el mediador de pH de Hanna GROCHECK amb sonda de 3m substituïble i connector BNC.



Il·lustració 34: Medidor de pH de Hannah instruments

És important tenir en compte que la duració d'un elèctrode no es infinita ja que l'elèctrode es un sensor basat en una cel·la electroquímica. Aquesta cel·la comença a sofrir desgast des de el moment de la seva fabricació. Aquest elèctrode en concret durarà depenent de la cura amb que es tracti de 3-12 mesos.

5.1.4. Espuma

Per tal de controlar la formació d'escuma s'han tingut en compte dues consideracions, una referent al disseny i l'altre referent al medi de cultiu.

En el medi de cultiu el que es fa en l'article de Sang-Hyun Pyo és afegir un agent antiespumant, específicament el polipropilenglicol.

Per altra banda si bé no s'ha afegit cap trencador d'escuma en el disseny si que s'ha deixat un espai a la part superior perquè la formació d'escuma o la agitació no provoqui xocs contra la part de dalt del fermentador o es produeixi obturació dels ports

5.1.5. Agitació

En el cas de l'estudi de Sang-Hyun Pyo l'agitació es mantenia a 1000 rpm (1). Molinari després de fer un estudi de diferents velocitats de rotació determinava que la millor opció eren 300 rpm (17). Com s'ha explicat anteriorment l'agitació es necessària per la transferència de nutrients entre fases així com per la correcta transferència de l'oxigen a la fase líquida. En el fermentador dissenyat s'escull una agitació de 500 rpm, un punt entremig per l'alt consum energètic que suposarien 1000 rpm.

En el cas de les reaccions microbianes s'acostuma a utilitzar una turbina Rushton i aquest és el cas d'aquest treball.



Il·lustració 35: Turbina Rushton extreta de la web de Fusion Fluid Equipment

5.1.6. Cultiu i manteniment del microorganisme

Si procedim igual que procediren Sang-Hyun Pyo i els seus col·laboradors i adquirim els *Gluconobacter oxydans* de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) el procediment a seguir serà el següent.

El cultiu ve dispostat en un medi conformat per glucosa, llevats, CaCO_3 i agar-agar. Els agar inclinats s'inoculen amb el cultiu mare en una solució al 20% de glicerol, i posteriorment son incubats a 28°C durant 2 dies, i després guardats a 4°C.

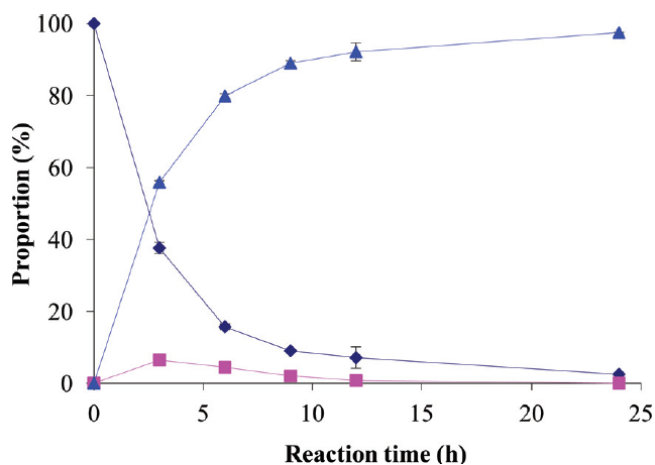
Per fer el precultiu, les cèl·lules superficials dels tubs inclinats es posen en 100 mL en un medi de fermentació en Erlenmeyers de 1L que contenen: 10 g de glicerol, 10 g d'extracte de llevat, 5 g de KH_2PO_4 a pH 5.5. Els flascons s'incuben en un agitador-incubador orbital a 28°C i 200 rpm 4 dies. Passat aquest temps s'utilitza per a inocular un fermentador per a produir la quantitat necessària de microorganismes.

5.2. Disseny de la fermentació

5.2.1. Duració dels cicles i productivitat

A partir de l'estudi publicat el 2012 per Sang-Hyun Pyo i altres col·laboradors (1) s'han escollit les condicions d'operació referents a la duració dels cicles.

A partir del gràfic proporcionat en l'estudi es pot escollir quin es el cicle ideal de treball.



Il·lustració 36: Conversió del substrat (◆, 2-metil-1,3-propandiòl), de l'intermedi (■, 2-metil-3-hidroxipropanal) i del producte (▲, àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic) utilitzant 2.6 mg/mL de bacteries (matèria seca) a $\text{pH}=7.2$ i 29°C utilitzant 7.5 g/L de substrat. (1)

Llegint aquest gràfic i tota la informació relacionada amb aquest en l'estudi de Pyo s'acaba decidint per una fermentació de 8 hores, s'observa que durant les 3 primeres hores s'ha assolit una conversió del 60% i que posteriorment la conversió del substrat comença a davallar, tornant-se marginal al cap de 8h. En aquest punt l'intermedi aldehyd s'ha consumit quasi tot i sembla per tant un bon moment per aturar la fermentació, doncs si deixem que continuï assolirem gaire bé la mateixa conversió però en un temps molt major

Així doncs a les 8 hores de fermentació tindriem una bona conversió del substrat i quedarien les proporcions de la següent forma:

- Un 2% en forma de l'intermedi 2-metil-3-hidroxipropanal:

$$0.02 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 0.15 \text{ g/L}$$

- Un 9% queda en forma de substrat que no ha reaccionat:

$$0.1 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 0.75 \text{ g/L}$$

- Un 88% del substrat s'hauria transformat a l'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic, és a dir que s'assoleix una productivitat de:

$$0.88 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 6.6 \text{ g/L}$$

Aquesta concentració serà la productivitat que esperem obtenir en la nostra fermentació al cap de les 8h que durarà.

Un altre punt important a tenir en compte és a les 3 hores:

- Un 37.8% restaria en la forma de substrat sense reaccionar:

$$0.378 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 2.835 \text{ g/L}$$

- Un 56.1% s'hauria convertit en àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic:

$$0.561 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 4.207 \text{ g/L}$$

- Un 6.1% en l'intermedi aldehid-2-metil-3-hidroxiopropanal:

$$0.61 \cdot \frac{7.5 \text{ g substrat}}{\text{litre}} = 0.4575 \text{ g/L}$$

En aquest moment tot i que la concentració de l'àcid no ha assolit un valor elevat és el moment on la concentració d'intermedi és major. Aquest intermedi té molt valor tant per la seva quiralitat com per l'alta reactivitat dels aldehids. Per aquesta raó s'ha dissenyat el bioreactor dotant-lo d'una aixeta a la part inferior mitjançant la qual se'n pot extreure el contingut quan es vulgui.

Si es vol precedir d'aquesta forma aleshores s'hauria de dissenyar un procés de separació adequat a tal efecte. Per exemple fent passar la solució per membranes selectives a àcids de cara a separar el component majoritari i posteriorment separar la mescla de substrat i intermedi mitjançant un procés de destil·lació, aprofitant els diferents punts de condensació de les substàncies, 212°C (PubChem) i 162°C (*Chemspider*) respectivament per el 2-metil-1,3-propandiòl i el 2-metil-3-hidroxiopropanal.

5.2.1. Disseny del fermentador pels microorganismes

La fermentació que es vol dur a terme en aquest treball, l'oxidació del 2-metil-1,3-propandiòl per l'acció dels *Gluconobacter oxydans*, requereix una contribució important d'aquestes bactèries. Per aquesta raó en aquest cas no es pot dur a terme un procediment habitual d'inocular el mateix fermentador que produeix l'àcid, el que s'ha de fer és un fermentador que funcioni en paral·lel mitjançant el qual obtinguem els bacteris.

L'objectiu d'aquest treball no és dissenyar aquest fermentador, per tant no se'n farà un disseny en 3D ni tampoc els plànols per a la seva construcció o la determinació de la seva geometria. El que sí que farem en aquest apartat es designar quines són les condicions de funcionament.

En l'estudi fet per Sang-Hyun Pyo es proporcionen certes dades d'interès per a saber

més coses sobre aquest fermentador (1). Aquestes es recullen a la taula 6.

Temperatura	28°C
pH	5.5
Agitació	500 rpm
Aeració	1 vvm
Duració	48h
Productivitat (matèria seca)	1.3 g/L

Taula 9: Condicions de la fermentació dels *Gluconobacter oxydans*

Per el control del pH a 5.5 s'utilitzen dues solucions, NH₄OH com a base i HCl com a àcid. A part per evitar problemes amb l'espuma s'afegirà polipropilenglicol quan sigui necessari.

És necessària una concentració de bactèries de 2.6 g/L en termes de matèria seca, per a que es donin les conversions desitjades d'àcid. El volum inicial de substrat que es posa en el fermentador és de 235 litres, i fent un càlcul fàcil es sap que el que necessitarem per respectar aquesta concentració de bactèries seran 612 g d'aquestes per a cada fermentació.

La fermentació dels microorganismes ens dóna una productivitat de 1.3 g/L de matèria seca, per tant:

$$\frac{612g}{1.3g/L} \cdot 2 = 940L$$

Que és el volum de treball necessari per a produir la quantitat desitjada. S'ha de tenir en compte que la fermentació principal dura 8 h, i aquesta en dura 48 h. En termes absoluts la diferència és molt gran, però si pensem en jornades laborals la única diferència és que la fermentació principal la farem un cop al dia i la referent als microorganismes un cop

cada dos. Per aquesta mateixa raó serà necessari doblar la productivitat de la més llarga per tal d'adaptar-la al ritme de la fermentació més curta.

Així doncs es poden plantejar diverses alternatives per aquest sistema de reactors:

OPCIÓ 1	2 fermentadors de 470L + 1 de 235L
OPCIÓ 2	5 fermentadors de 235L
OPCIÓ 3	1 fermentador de 940L + 1 de 235L

Taula 10: Opcions de combinacions de reactors

Sembla que les dues primeres opcions són les més vàlides, doncs un fermentador de 940L s'allunyaria bastant del paràmetres típics de l'escala pilot. Per altra banda l'opció 2 seria important considera-la, doncs el fet que la concentració de bactèries obtinguda sigui just la meitat que la requerida per la fermentació principal, 1.3 i 2.6 respectivament, possibilita que puguem utilitzar el mateix disseny que en el fermentador per a la producció de l'àcid. Tot i així s'ha de tenir en compte que com més reactors s'utilitzin més costos associats al consum energètic o a l'establiment de sistemes de control hi haurà. Finament el sistema escollit serà el corresponent a l'opció 1, una opció entremig de les altres dues. Les dimensions estaran dins dels paràmetre típics de l'escala pilot i no s'usen un nombre tant elevat de bioreactors.

Aquesta configuració té dues avantatges. Cada bioreactor per si sol produeixi la quantitat necessària de bactèries per una fermentació, per tant ens estalviarem els costos associats a la conservació de les bactèries. Això no passaria amb la opció 3, la meitat de la producció del qual s'hauria d'emmagatzemar fins el dia següent. L'altra avantatja és sobre l'opció 2, que implicaria un operari altament especialitzat, doncs hauria de controlar a la vegada 5 bioreactors.

5.2.2. Volum de treball i volum del fermentador

Per tal de començar a fer el disseny el que s'ha fet primer de tot és escollir quina seria la producció desitjada. S'ha decidit fixar-se un objectiu de 350 kg d'àcid. A partir d'aquesta producció s'ha pogut determinar el volum final del fermentador de la següent forma.

Es volen produir anualment 350 kg i habitualment en un any es treballen uns 225 dies en jornades de 8h, que és el que dura la fermentació:

$$\frac{350,000 \text{ g àcid}}{1 \text{ any}} \cdot \frac{1 \text{ any}}{225 \text{ dies treballats}} \cdot \frac{1 \text{ dia}}{1 \text{ fermentació}} = 1555.56 \text{ g àcid/fermentació}$$

A partir d'aquesta dada i de la productivitat, 6.6 g/L, podem calcular el volum de treball:

$$\frac{1555.56 \text{ g àcid}}{\text{fermentació}} \cdot \frac{L \text{ fermentació}}{6.6 \text{ g àcid}} = 235.69 \frac{L}{\text{fermentació}}$$

El volum de treball és un 70-80% del volum total del fermentador per contrarestar la formació d'espuma. En aquest cas no hi ha informació referent a aquest problema, però en l'estudi que s'està prenent com a guia es fa ús d'un agent antiespumant en el cultiu de les bacteries, per tant s'ha decidit ser prudents en aquest aspecte i deixar espai suficient.

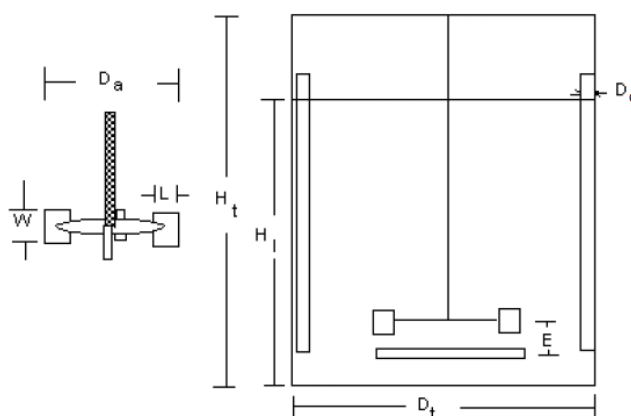
$$V_{treball} = V_{total} \cdot 0.7$$

$$V_{total} = \frac{235.69}{0.7} = 336.7 \text{ L}$$

Aquest volum per tal de facilitar el disseny s'arrodoneix a l'alça a 350L que serà el volum definitiu del fermentador dissenyat en aquest treball.

5.2.3. Paràmetres de forma del fermentador

El tipus de fermentador que s'ha escollit per a la producció de l'àcid ha estat un reactor discontinu de tanc agitat, amb una mètode d'operació de tipus Batch. Per a fer el disseny s'han seguit una sèrie de dimensions relatives totes elles recollides en la taula 5. (52)



Il·lustració 37: Geometria típica d'un fermentador de tanc agitat (52)

Altura del líquid en relació a l'altura del reactor	H_l/H_t	0.7
Altura del reactor en relació al diàmetre	H_t/D_t	1.5
Diàmetre de la turbina en relació al diàmetre del tanc	D_a/D_t	0.33
Diàmetre dels deflactors en relació al diàmetre del tanc	D_d/D_t	0.09
Altura de la fulla de la turbina en relació amb el diàmetre de la turbina	W/D_a	0.2
Amplada de la fulla de la turbina en relació al diàmetre de la turbina	L/D_a	0.25
Distància de l'anell ruixador al mig de la turbina	E/W	1

Taula 11: paràmetres de disseny d'un fermentador de tanc agitat. Valors extrets de (52)

5.2.4. Determinació de la geometria del recipient

Arribats a aquest punt és necessari trobar les dimensions característiques del fermentador. El fermentador que s'ha dissenyat és de cos cilíndric amb una cúpula a la part de dalt i una cúpula invertida a la part de baix, per tant a l'hora de considerar el volum s'han de considerar que aquestes dues també. Per a fer-ho es planteja la següent equació de cara a fer una primera estimació, que descriu que el volum és només degut al cilindre.

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H$$

I dels paràmetres de disseny sabem que $H=1.5 \cdot D$, i per tant:

$$0.35 = \frac{\pi}{4} \cdot \left(\frac{H}{1.5}\right)^2 \cdot H$$

D'on trobem que $H=1.00089 \text{ m} \cong 1 \text{ m}$. Així decidim que la cúpula de dalt tindrà una altura $h_1=12 \text{ cm}=0.12 \text{ m}$ i la de baix una lleugerament inferior, $h_2=10 \text{ cm}=0.1 \text{ m}$.

Ara podem trobar les dimensions exactes. Sabent el volum d'una cúpula:

$$V_c = \frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot (3R - h) \text{ i } R = \frac{D}{2} = \frac{2}{3} \cdot H$$

Podem escriure el volum total del reactor de la següent forma:

$$V = \frac{\pi}{4} \cdot D^2 \cdot H + \frac{\pi \cdot h_1^2}{3} \cdot (H - h_1) + \frac{\pi \cdot h_2^2}{3} \cdot (H - h_2) \quad \text{Eq. 26}$$

On substituint:

$$0.35 = \frac{\pi}{4} \cdot \left(\frac{H}{1.5}\right)^2 \cdot H + \frac{\pi \cdot 0.12^2}{3} \cdot (H - 0.12) + \frac{\pi \cdot 0.1^2}{3} \cdot (H - 0.1)$$

Obtenim finalment uns valors de:

$$H = 0.9793 \cong 0.98 \text{ m}$$

$$D = 0.65286 \cong 0.65 \text{ m}$$

5.2.5. Deflectors

La importància dels deflectors rau en evitar la formació de vòrtex i de forts corrents, és molt habitual l'ús d'aquests i se solen usar nombres parells.

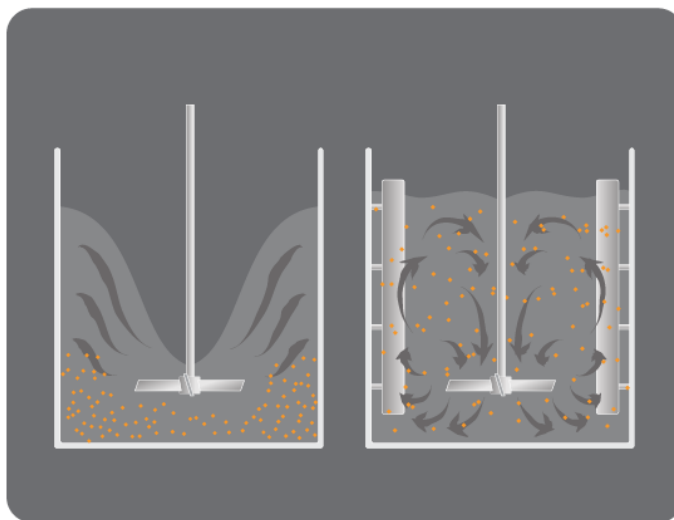
En el cas del nostre treball s'utilitzaran 4 deflectors instal·lats a les parets del fermentador a 90°C l'un de l'altre.

El diàmetre dels deflectors s'ha calculat amb els paràmetres de disseny mostrats anteriorment:

$$\frac{D_d}{D_t} = 0.09$$

$$D_d = 0.09 \cdot 0.65 = 0.0585 \text{ m}$$

L'espessor dels deflectors s'ha escollit que sigui de 1 cm donat que és habitual que siguin plaques planes, l'altura serà igual a la de la part cilíndrica del fermentador.



Il·lustració 38: La figura de l'esquerra esquematitza el funcionament d'una turbina axial o radial sense deflectors, la de la dreta una que sí que en disposa. (53)

5.2.6. Agitador i motor

Com ja s'ha explicat l'agitador escollit és una turbina Rushton, d'ús habitual en reactors biològics. S'ha escollit una turbina de 6 pales i a continuació es mostren els càlculs fets per saber-ne la geometria.

$$\frac{D_a}{D_t} = \frac{1}{3}; \frac{W}{D_a} = \frac{1}{5}; \frac{L}{D_a} = \frac{1}{4}; \frac{E}{W} = 1$$

$$D_a = \frac{1}{3} \cdot 0.65 = 0.216667 \text{ m} \cong 0.217 \text{ m}$$

$$W = \frac{1}{5} \cdot 0.217 = 0.0434 \text{ m} \cong 0.043 \text{ m}$$

$$L = \frac{1}{4} \cdot 0.217 = 0.05425 \text{ m} \cong 0.054 \text{ m}$$

$$E = 0.043 \text{ m}$$

Aquestes serien les dimensions de la turbina Rushton del fermentador dissenyat. Tot i això hi ha hagut una altra problemàtica. Les dimensions del tanc, i sobretot l'alçada d'aquest fan pensar que podria ser necessari la introducció d'una segona turbina instal·lada sobre el mateix eix que l'altra.

Aquesta hipòtesis s'ha vist confirmada mitjançant la següent equació, extreta de la tesis de Ryan Z. Davis. (54)

$$\frac{H_l - D_a}{D_a} > n > \frac{H_l - 2D_a}{2D_a} \quad \text{Eq. 27}$$

On n és el número de turbines, H_l l'altura del líquid i D_a el diàmetre de les turbines. Per aplicar-la abans s'ha de trobar l'altura del líquid que es trobarà de forma semblant que quan s'ha buscat l'alçada del cos cilíndric (Eq. 26), ara entenent que el líquid ocuparà la cúpula inferior (h) i part del mateix cos cilíndric (H_{lc}), encara que no tot.

$$H_{lc} \frac{\pi \cdot D^2}{4} + \frac{\pi \cdot h^2}{3} \cdot (3R - h) = V_l \quad \text{Eq. 28}$$

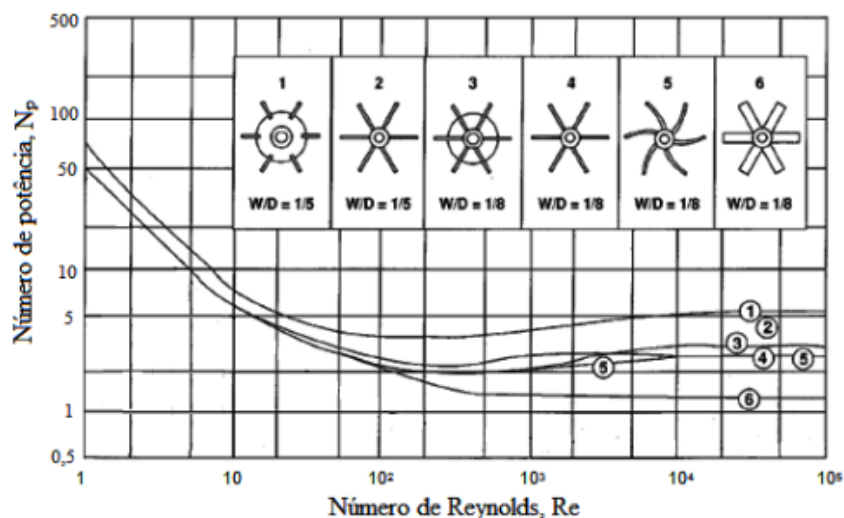
Que dona un valor de $H_{lc} = 0.68$ m i per tant l'altura del líquid $H_l = 0.68 + 0.1 = 0.78$ m. Així doncs ara podem aplicar l'equació 27.

$$2.59 > n > 1.59 \rightarrow n = 2 \text{ turbines}$$

Per tant a causa de les dimensions del fermentador seran necessàries 2 turbines. La única condició per donar per vàlida aquesta equació és que la turbina inferior estigui almenys a un diàmetre de la part inferior del fermentador, que les turbines tinguin una separació entre un diàmetre i dos, i que la turbina superior estigui almenys a un diàmetre i mig de la superfície del líquid. (54)

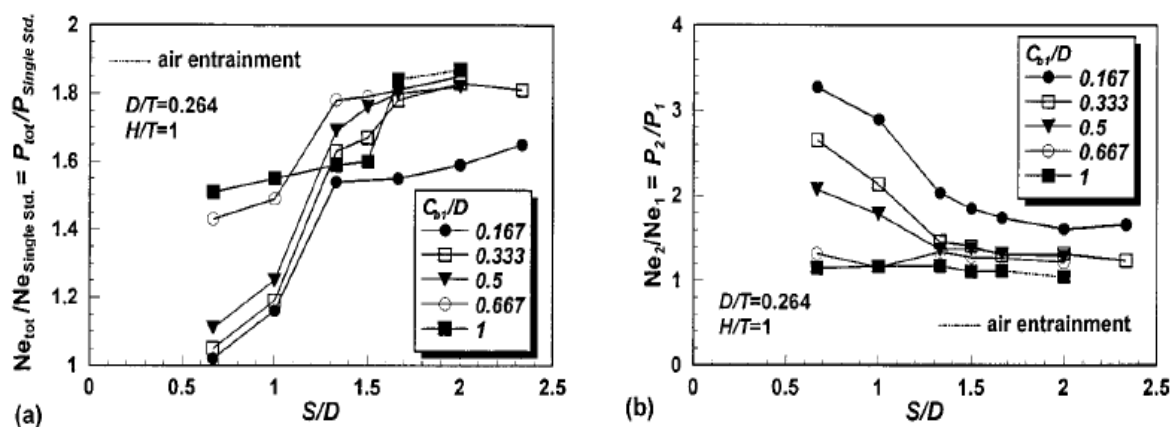
Donat que es complien aquestes condicions s'ha decidit separa les turbines una distància de 0.237 m, aproximadament $1.1 D_a$.

Un cop calculades les dimensions del sistema d'agitació serà necessari determinar la potència necessària de cara a adquirir un motor adequat per fer funcionar el mencionat sistema. Aquest procediment es duu a terme a partir dels números de potència i de Reynolds, i utilitzant el següent gràfic:



Il·lustració 39: Gràfica Re vs. N_p per diferents turbines. La d'aquest treball és la corba 1. (55)

En general s'ha trobat en diferents articles que com a màxim la potència consumida serà igual a la suma de la potència consumida individualment per cada turbina. Nienow i Lily trobaren que el nombre de potència consumit per n turbines era aproximadament n vegades el nombre de potència d'una turbina (56). Kuboi i Nienow (1982) van trobar que per un sistema de doble turbina Rushton amb $H/D=1$ els nombres de potència per la turbina inferior, la superior i el combinat eren 3.6, 3.9 i 7.5. Armenante (1998) ens proporciona dos gràfics que relacionen el nombre de potència total en relació amb el d'una sola turbina i el nombre de potència de la turbina de baix amb el de dalt. (57)



Il·lustració 40: Gràfics de l'estudi d'Armenante sobre la potència de l'agitador (57)

En el nostre cas ($C_{b1}/D_a=1$, $S/D_a=1$) s'observa que el nombre de potència total serà 1.6 vegades el nombre de potència amb una sola turbina (gràfic A) i que els nombres de potència seran aproximadament iguals en les dues turbines. Per tant podem fer els càlculs seguint aquestes dades.

Podem assumir que les propietats del líquid seran les de l'aigua ja que la concentració de substrat és de 7.5 g/L, és a dir 7.5 g de substrat per cada 992.5 g d'aigua aproximadament. Calculem el Número de Reynolds:

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D_a^2}{\mu} = \frac{1000 \cdot 8.33 \cdot 0.217^2}{1 \cdot 10^{-3}} = 392408$$

Mirant al gràfic tenim un número de potència de 5, per tant seguint les recomanacions de Armenante un número de potència total $N_{po}=1.6 \cdot 5=8$. Així doncs podem calcular la potència com:

$$N_{po} = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \rightarrow P = 2227W$$

Suposant un rendiment del 80%:

$$P_c = \frac{17821}{0.8} = 2784W$$

Per tal d'assegurar-nos que funcioni usarem un motor de 3kW.

5.2.7. Aeració

Ja s'ha dit que l'aeració escollida seria de 1vvm (vessel volumes per minute), en unitats més entenedores serien 350 L/minut, és a dir 5.83L/s.

El sistema utilitzat constarà d'un compressor, un filtre per esterilitzar l'aire i un anell difusor, per calcular la potència necessària s'usarà la següent fórmula, extreta d'un llibre de tractament d'aigües (58):

$$P = 0.1 \cdot Q \cdot \left[\left(\frac{P_d}{P_a} \right)^k - 1 \right] \quad \text{Eq. 29}$$

P és la potència en KW, Q el cabal en m³/h i P_d i P_a les pressions absolutes dins i fora. K és un coeficient que val 0.2857. La pressió P_a és l'atmosfèrica i és de 101325, la P_d es refereix a la pressió en el punt on hi ha l'airejador, i serà l'atmosfèrica més la deguda al líquid:

$$P_d = P_{atm} + \rho \cdot g \cdot h = 101325 + 1000 \cdot 9.81 \cdot (0.780 + 0.043 - 0.217) = 107269.86 Pa$$

$$P = 0.1 \cdot 20.98 \cdot \left[\left(\frac{107269.86}{101325} \right)^{0.2857} - 1 \right]$$

Que donaria una potència del compressor necessària de 0.03358 kW, és a dir 33.5 W.

5.2.8. Disseny de l'aïllant

Introduïrem els 235.6 L de substrat a una temperatura de 31°C, una mica superior a la òptima, 28°C. Mitjançant un aïllant durant el temps que dura la fermentació la temperatura no baixarà de 28°C. És necessari saber l'espessor necessària d'aïllant.

$$Q = m \cdot c_p \cdot \Delta T \quad \text{Eq. 30}$$

$$Q = -k \cdot A \cdot \frac{\Delta T}{L} \quad \text{Eq. 31}$$

L'únic balanç que tindrà rellevància és el referent a l'aïllant ja que el balanç interior del tanc es pot menysprear degut a l'alta conductivitat de l'acer que conforme aquest últim. A més s'ha fet una altra simplificació, en aquest cas geomètrica. S'ha mirat el fermentador com una placa plana on tot el calor es dissiparia per el cos cilíndric, essent així l'àrea de transferència $A = \pi \cdot D^2 \cdot H / 4$. Per tant:

$$Q = 235.6 \text{ Kg} \cdot 4181 \frac{\text{J}}{\text{Kg} \cdot \text{K}} \cdot \left(\frac{3\text{K}}{8\text{h}} \right) \cdot \frac{1\text{h}}{3600\text{s}} = 102.6\text{W}$$

Substituint aquest valor en l'Eq. 31 i sabent que $A = 0.325 \text{ m}^2$:

$$-102.6 = -\frac{k}{L} \cdot 0.325 \cdot (31 - 20)$$

$$\frac{k}{L} = 28.68$$

Sabent que l'aïllant escollit té una conductivitat tèrmica de 0.038 W/K·m obtenim un espessor de 0.13 cm.

Fent els mateixos càlculs amb el mateix aïllant però canviant la temperatura a la que el substrat és introduït a 30 i 29 °C acabem obtenint uns gruixos de 0.18 cm i 0.33 cm respectivament. S'ha de tenir en compte que per a fer els càlculs s'han usat simplificacions, una de les quals menysprea tota la calor cedida per les cúpules superior i

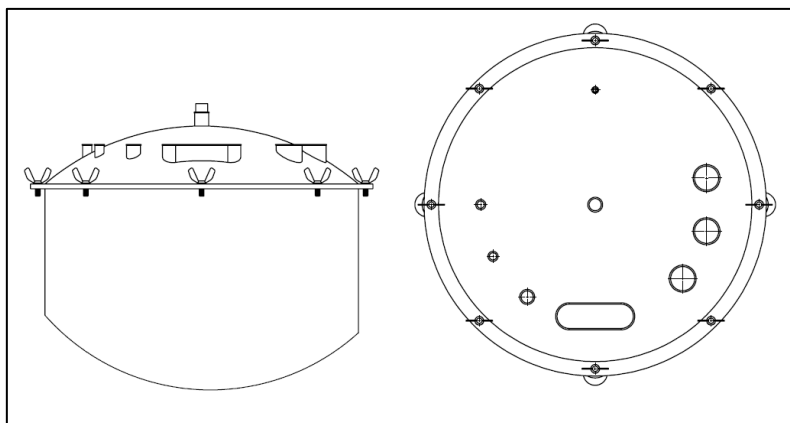
inferior, per tant introduir el substrat a la temperatura de 29°C o a la òptima de 28°C podria portar a problemes a mitja fermentació. Per aquestes raons s'escull introduir el substrat a 30°C, que és dins del rang de temperatures on treballa bé la bactèria escollida però no és suficientment baixa per a que ens preocupi que baixi per sota.

L'aïllant que s'ha trobat es ven en rotlles de 8 cm de gruix, que és un espessor molt major a la necessària. Tot i així és de fàcil disponibilitat, econòmic i fàcilment instal·lable, per tant mantindrem l'elecció.

5.2.9. Vàlvules i ports

5.2.9.1. Tapa

La tapa de forma semiesfèrica s'ha dissenyat així per donar un espai extra en cas de formació d'espuma. Com es pot observar al dibuix s'han practicat una sèrie de forats a la tapa.



Il·lustració 41: Vista de la tapa. De la forma semiesfèrica i de les diferents entrades i sortides.

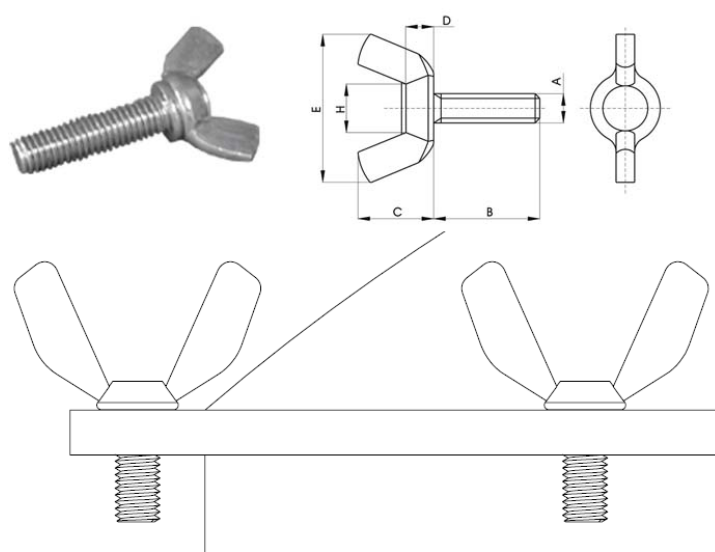
El central és per l'eix sobre el qual rotarà la doble turbina Rushton. Els tres de la dreta per ser entrades. Tot i que a la pràctica es podria afegir tot pel mateix s'ha pensat que s'hi es vol afegir un sistema per afegir base es requerirà la instal·lació d'una canonada fixa, i d'igual forma amb les bactèries. S'ha disposat una entrada extra per qualsevol afegit.

A la part esquerra del dibuix hi ha 3 forats més. El primer seguint les agulles del rellotge és una sortida d'aire, doncs si es va bombejant aire i aquest no disposa d'una sortida es podria incrementar la pressió, provocant un accident o perjudicant els microorganismes. Els altres dos, d'igual mida, són entrades per sondes de temperatura i pH.

Els dos forats que queden, a la vertical del mig del dibuix, són per l'entrada de l'airejador

el de dalt, i per introduir-hi el substrat el de baix, que s'ha dissenyat molt més gran que els altres per possibilitar un afegiment manual al estar parlant d'una escala pilot.

Finalment s'ha de mencionar que s'ha ajuntat la tapa del fermentador amb el cos cilíndric mitjançant un sistema de palometes de fàcil extracció com s'observa a la il·lustració 34. Això s'ha fet per tal que sigui fàcil separar-los per revisar el sistema agitador o qualsevol altra possibilitat que requereixi accedir dins el recipient. Una soldadura en aquest cas no seria pràctica. Aquestes palometes s'obtindrien de l'empresa MIKALOR, fetes d'acer zincat. Les seves dimensions són: A=10, B=25, C=37.3, D=6.3 i H=11 mm.



Il·lustració 42: Sistema de tancament del fermentador. Dibuix superior de MIKALOR i detall inferior del fermentador dissenyat.

5.2.9.2. Sortides

A la part de sota del reactor s'hi han practicat dues obertures per tal de poder extreure'n el contingut. Tot i que es podria haver fet un forat d'una mida universal s'ha decidit abans fer una estimació de la superfície necessària.

Volem que el buidat duri 1 min. Podem calcular el cabal de la següent forma:

$$Q = \frac{235.6}{60} = 3.92 \cdot 10^{-3} m^3/s$$

S'ha estimat quina seria la velocitat del fluid al sortir mitjançant la llei de Torricelli que defineix la velocitat d'un fluid sortint per un orifici a una profunditat h, que és l'altura del

líquid calculada anteriorment a l'apartat 5.2.7., ja que està a sota de tot; i integrant aquesta velocitat en tota l'altura del líquid.

$$\bar{v} = \frac{1}{H_l} \cdot \int_0^{H_l} \sqrt{2gh} \cdot dh \quad \text{Eq. 32}$$

$$\bar{v} = \frac{1}{0.78} \int_0^{0.78} \sqrt{2 \cdot 9.81 \cdot h} \cdot dh = 5.678 \cdot \left[\frac{2\sqrt{h^3}}{3} \right]_0^{0.78} = 2.6 \frac{m}{s}$$

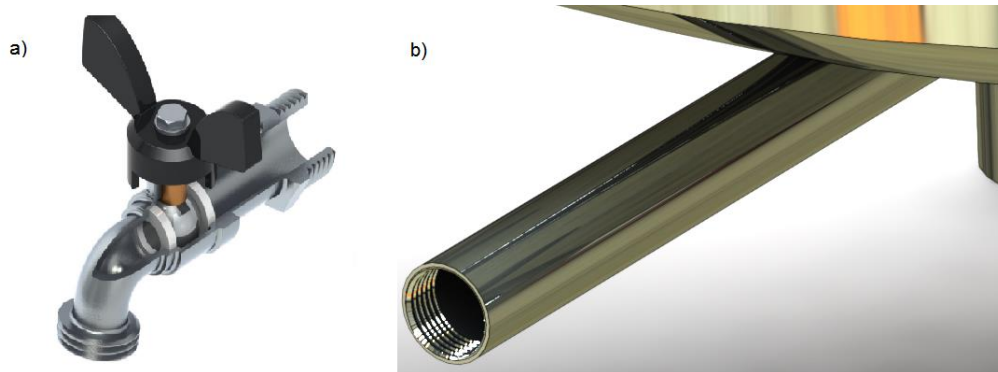
$$Q = \bar{v} \cdot A \rightarrow A = 1.5 \cdot 10^{-3} m^2 = 15 cm^2$$

Com que la sortida és per una canonada cilíndrica en podem saber el radi.

$$S = \pi \cdot \frac{D^2}{4} \rightarrow D = \sqrt{\frac{S}{\pi}} = 4.37 cm \text{ o } 43.7 mm$$

Per evitar problemes deguts a l'estimació que s'ha fet s'augmentarà un 30% quedant en 57 mm. Així doncs aquest serà el diàmetre de la sortida principal que es connectarà a una canonada o mànega.

Pel cas de l'aixeta l'elecció del diàmetre no ha estat possible, doncs difícilment dissenyarem una aixeta quan és molt més senzill adquirir-ne una. D'aquesta manera s'ha trobat un model interessant i s'ha dissenyat la canonada segons les especificacions d'aquest model, mitjançant una unió per roscat de pas 1.814 mm i un diàmetre de 21 mm.



Il·lustració 43: Model d'aixeta escollit. Extret del domini públic de GRABCAD (A) i detall de la canonada de sortida amb renderitzat (B).

En aquest cas el buidat no es donarà en menys de un minut. Però no és un impediment doncs aquesta aixeta està pensada per a extreure mostres per saber en quin punt de la fermentació estem, o extreure l'intermedi aldehid si interessa.

$$Q = 2.6 \cdot 3.46 \cdot 10^{-4} = 9 \cdot 10^{-4} \frac{m^3}{s}$$

$$t = \frac{V}{Q} = \frac{0.2356}{9 \cdot 10^{-4}} = 261.62 \text{ s} \rightarrow 4 \text{ min i } 21 \text{ s}$$

5.2.9.3. Vàlvules

En totes les entrades i sortides s'utilitzaran vàlvules. En general en tots els casos només ens interessen les posicions d'obert i tancat així que el que utilitzarem seran les vàlvules de bola, adequades per a aquest ús.

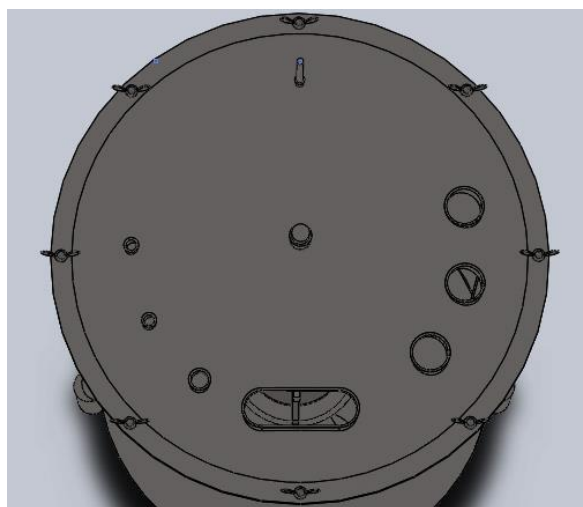


Il·lustració 44: Vàlvula de bola de l'empresa GENEBRE i vàlvula de seguretat de seguretat de GENERANT

En el cas de la sortida d'aire s'utilitzarà una vàlvula de seguretat. Aquest tipus de vàlvula s'usa per evitar pressions grans i s'obre de cop quan la pressió és excessiva.

5.3. Disseny en Solidworks®

En aquest apartat es mostraran diferents vistes del disseny fet amb Solidworks®.



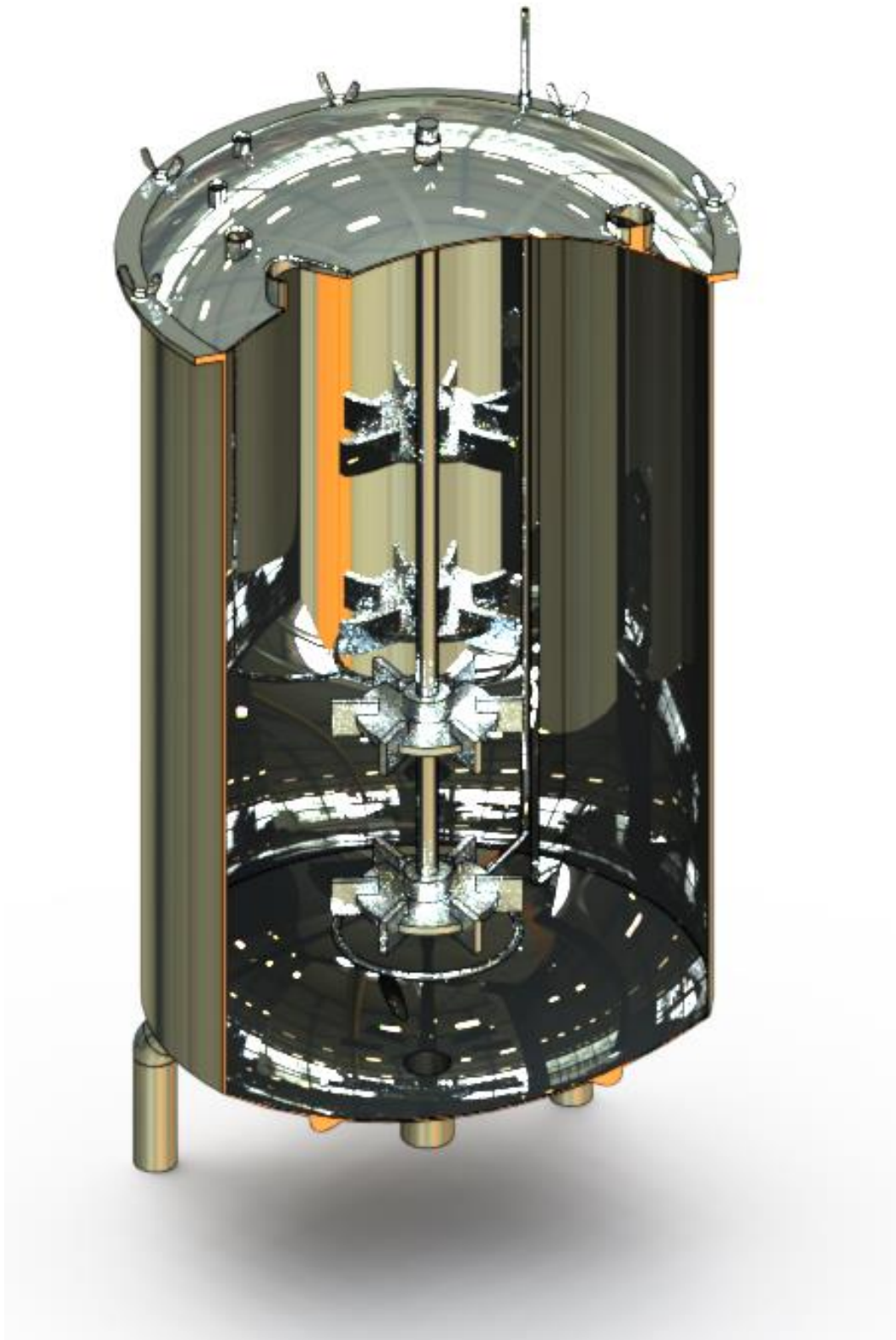
Il·lustració 45: Vista de la tapa superior. Sense renderitzar



Il·lustració 46: Vista en detall de la tapa amb renderitzat



Il·lustració 47: Vista en detall de la part baixa amb renderitzat



Il·lustració 48: Vista de secció en perspectiva amb renteritzat

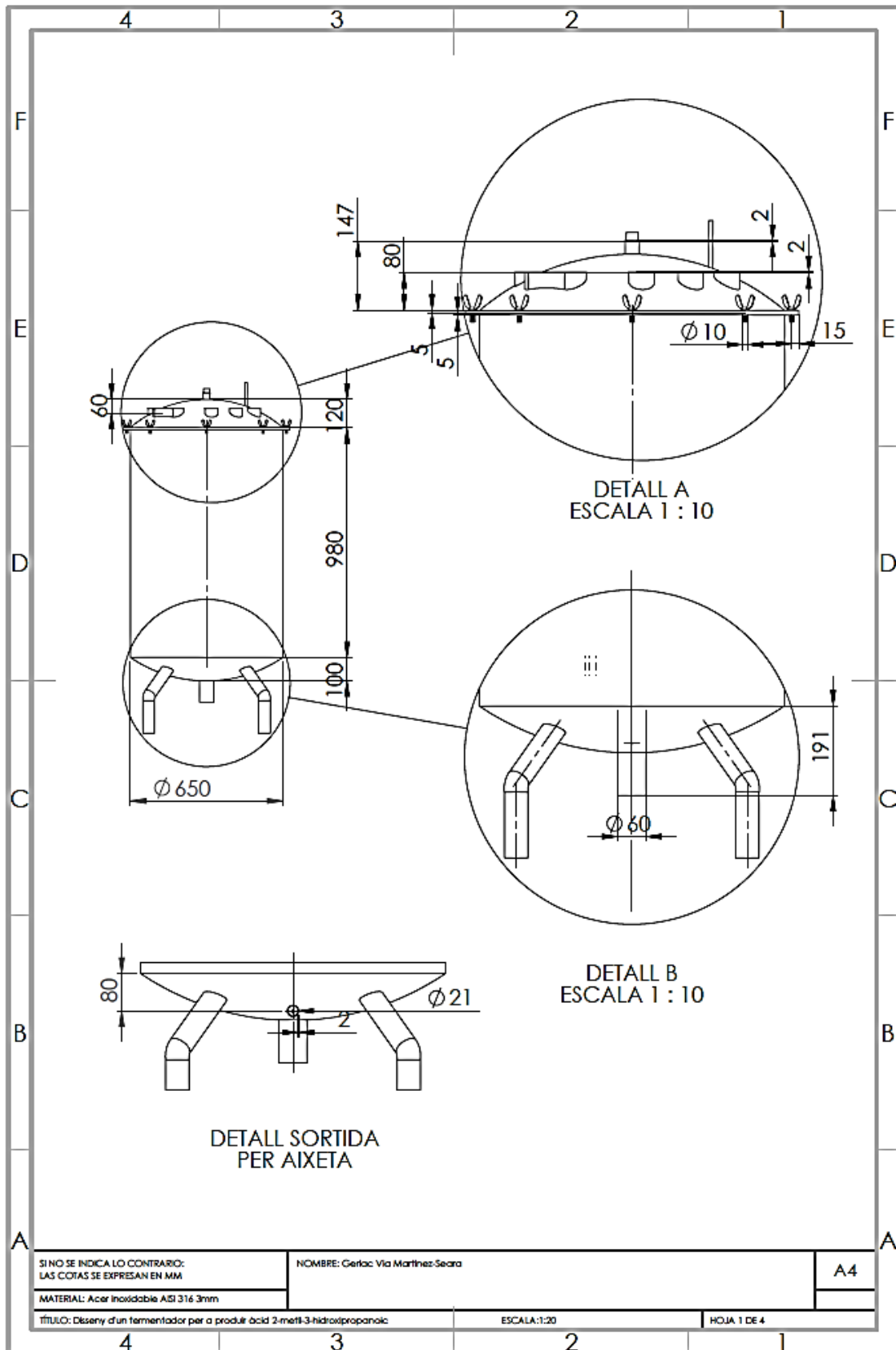


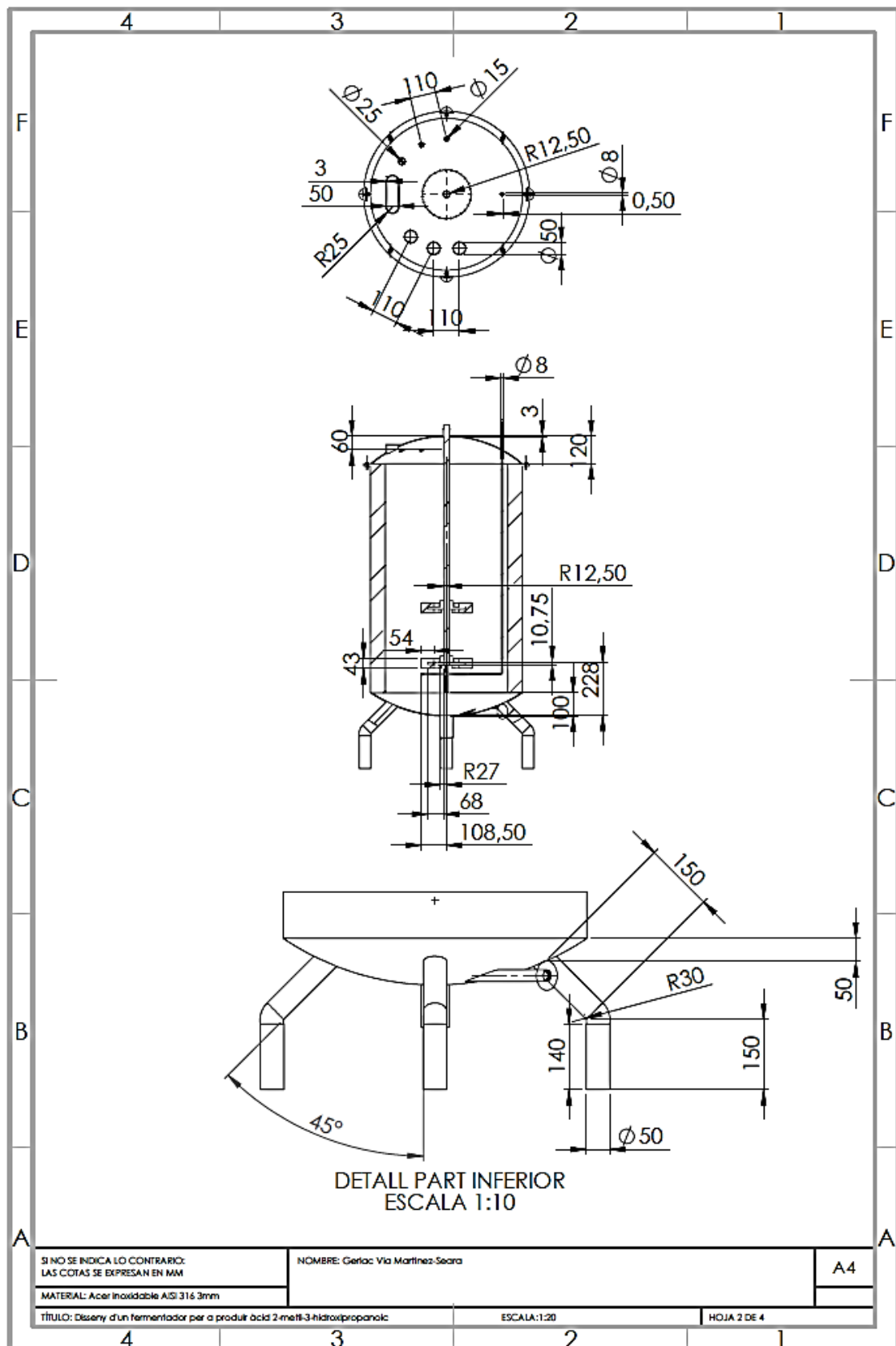
Il·lustració 49: Vista amb perspectiva dimètrica del fermentador amb renderitzat

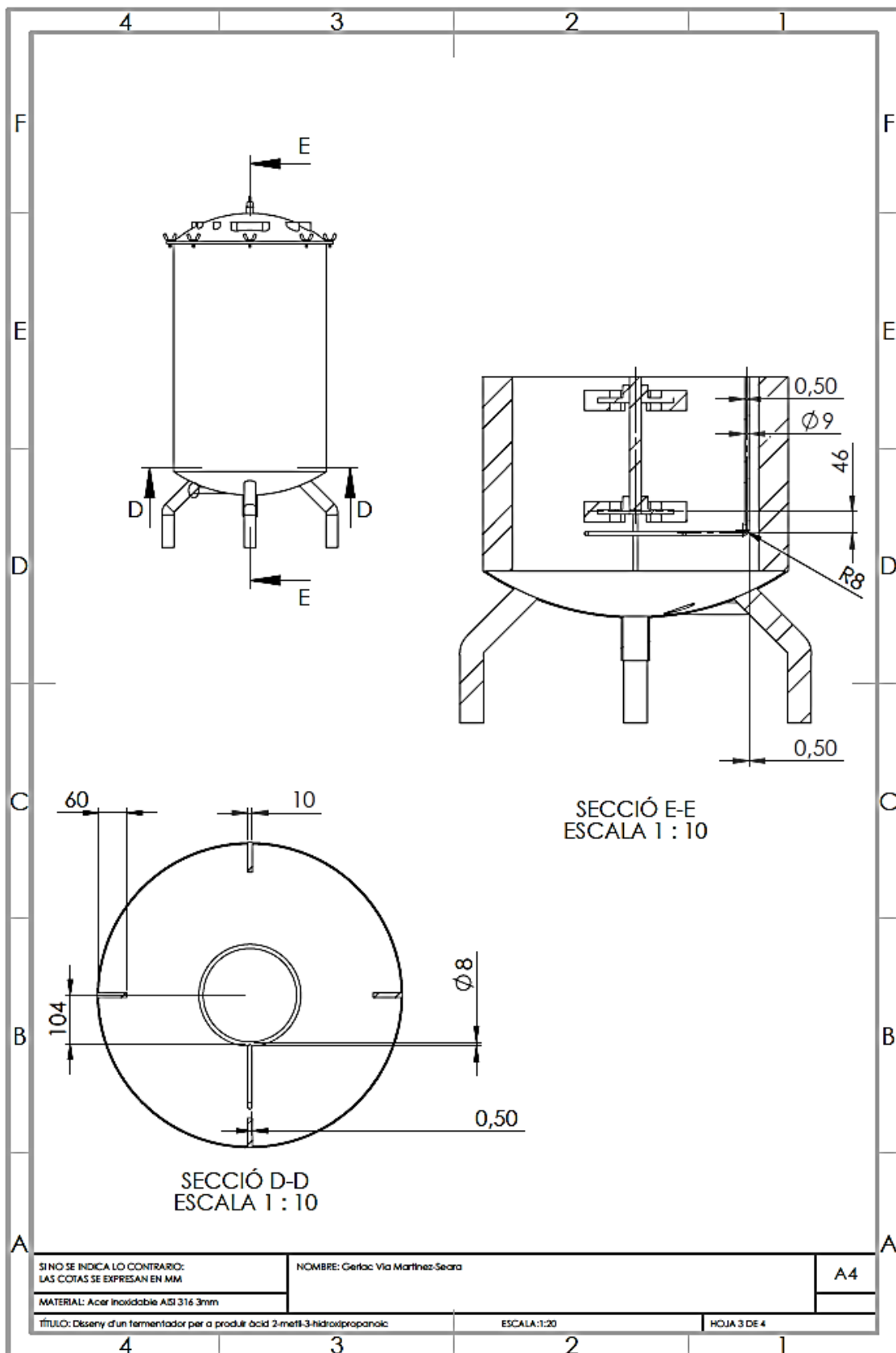


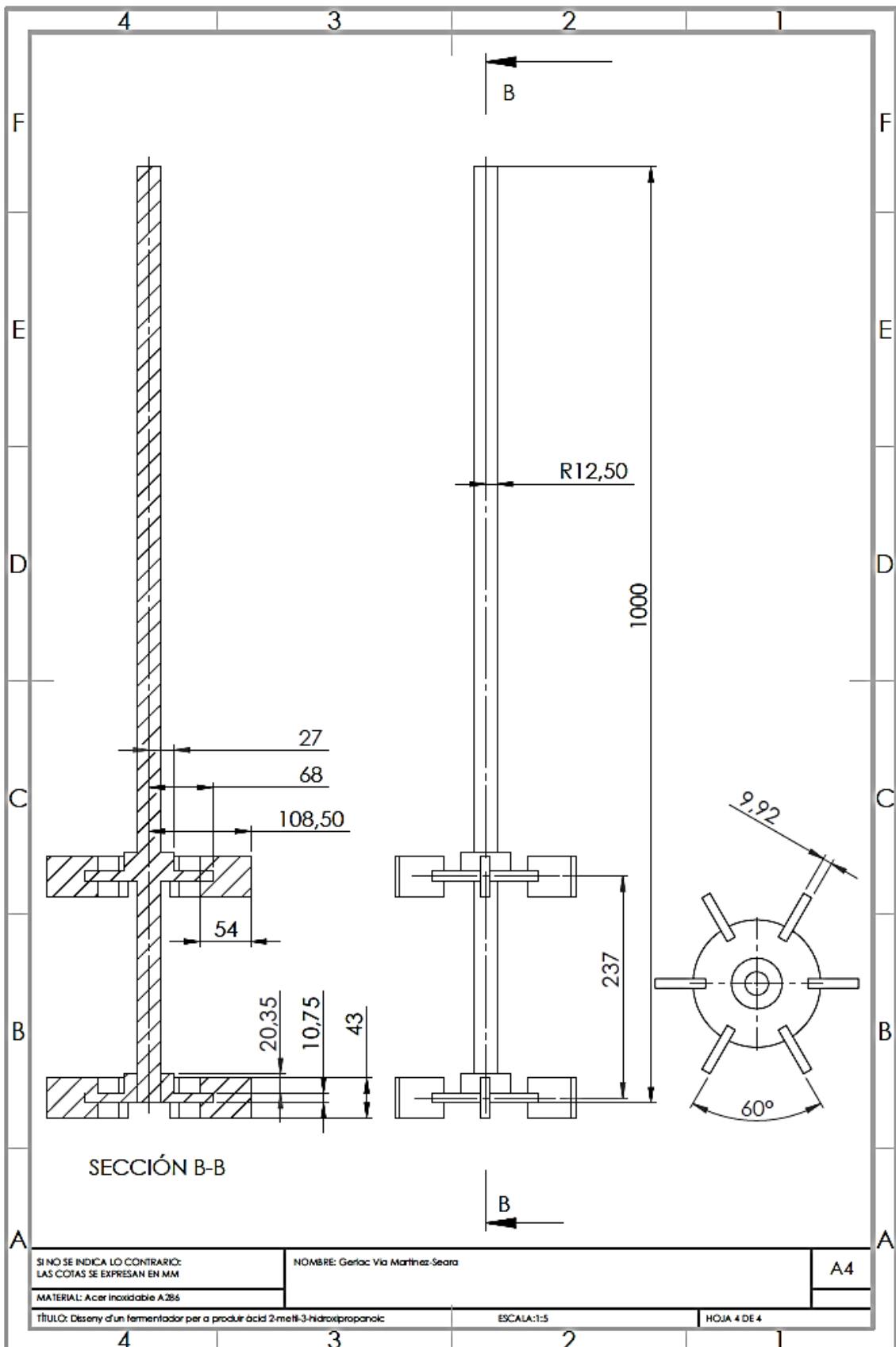
Il·lustració 50: Vista posterior del fermentador amb renderitzat

5.4. Plànols del Disseny









5.5. Pla d'operacions i seguretat

Donat que la fermentació per a produir l'àcid requereix una gran quantitat inicial de microorganismes s'ha necessitat dissenyar una altra fermentació per tal de cultivar-los. Això fa que l'operació d'aquesta fermentació sigui una mica més complexa a nivell de logística i s'ha cregut, per tant, convenient descriure'n el que creiem que seria una bona forma de procedir.

S'ha de contar que una vegada acabada la fermentació per a la producció de microorganismes, es requerirà d'un temps de una o dues hores abans de començar amb la fermentació principal (buidat del reactor, centrifugat del producte, esterilització, etc.).

Així doncs degut als temps de les fermentacions es planteja la necessitat de contar amb dos operaris per tal de poder controlar aquestes dues fermentacions.

Mirem en la següent taula com es planejarien les fermentacions al llarg d'una setmana:

	8h	9h	10h	11h	---	17h	18h	19h
DILLUNS	fi MO1	Inic. MO1						
	MO2							
		Inic. AC					Fi AC	
DIMARTS	MO1							
	fi MO2	Inic. MO2						
		Inic. AC					Fi AC	
DIMECRES	fi MO1		Inic. MO1					
	MO2							
		Inic. AC					Fi AC	
DIJOUS	MO1							
	fi MO2							
		Inic. AC					Fi AC	
DIVENDRES	fi MO1							
		Inic. AC					Fi AC	
DISSABTE	Inic. MO1							
DIUMENGE	Inic. MO2							
	MO1							

Taula 12: Planificació fermentació. MO1: fermentació bacteries en reactor 1; MO2: fermentació bacteries en reactor 2; AC: fermentació àcid

La fermentació principal (AC) es controlarà tota l'estona, la fermentació dels microorganismes només les primeres 3 de 48 h, per controlar que tot vagi bé.

Així doncs serà necessari treballar 9h/dia de dilluns a divendres i 3h dissabte i diumenge.

Això són 51h/setmana, superior al màxim permès per llei de 40h/setmanals de manera que requerirem 2 operaris que faran horaris alternants cada setmana de manera que cap es quedi sense caps de setmana sempre.

	Hores de feina	Operari
DILLUNS	9	1
DIMARTS	9	1
DIMECRES	9	2
DIJOUS	9	2
DIVENDRES	9	1
DISSABTE	3	2
DIUMENGE	3	2

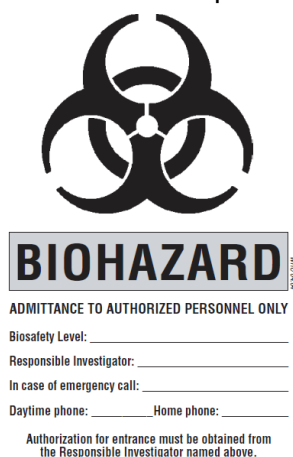
Taula 13: Hores de feina diàries

En quan a la seguretat del procés aquesta serà la mateixa per qualsevol fermentació que utilitzi microorganismes de nivell de risc 1 segons la World Health Organization (16).

Tot i que per aquest grup no són necessàries mesures de seguretat especials, desde la World Health Organization recomanen seguir sempre un protocol conforme a un nivell 2, que implica:

Accés:

1. Mostrar a les portes el símbol internacional de perill biològic.



Il·lustració 51: Símbol de perill biològic per portes de laboratori (16)

2. Només permetre accés a personal autoritzat.
3. Portes sempre tancades.

Protecció personal:

1. Ús de vestimenta adequada (guants protectors, bates o uniformes, ulleres de seguretat).
2. Rentar-se les mans abans i després d'entrar en contacte amb el microorganisme.
3. No menjar, beure, fumar, utilitzar cosmètics o manipular lents de contacte.
4. No dur calçat obert.

Procediments:

1. Evitar procediments que puguin propiciar la formació d'aerosols.
2. Reportar qualsevol tipus d'accident al supervisor del laboratori i guardar per escrit la informació referent a aquests.
3. Tractar qualsevol substància contaminada abans de llençar-la.

Zona de treball:

1. Mantenir-la neta, ordenada i lliure de qualsevol objecte que no sigui necessari.
2. Descontaminar qualsevol superfície on hi hagi hagut un vessament i al final del dia.
3. Empaquetaments i transports han de seguir la regulació vigent.
4. Si les finestres es poden obrir han de instal·lar-se barreres a prova d'artròpodes.



Il·lustració 52: Ulleres de seguretat, guants de nitril i vestimenta apropiada (59)

6. Estudi econòmic

	Component	Preu	Unitats	Quantitat	Preu total (€)
Bioreactor	Vas A316L 3mm de gruix	68,12 ²	€/Kg	47 Kg	3203,83
	Tapa A316L 3mm de gruix	68,12 ²	€/Kg	3,18 Kg	216,77
	Cul A316L 3mm de gruix	68,12 ²	€/Kg	2,75 Kg	187,46
	Deflectors A316L 10mm de gruix	68,12 ²	€/Kg	4,5 Kg	306,75
	Palometes Acer zincat	0,9031	€/u	8	7,22
	Vàlvula de bola	90,96	€/u	2	181,92
	Agitació i Aeració	Motor 3KW	770	€/u	1u
Turbina Rushton		135	€/u	2u	270
Motor 100 W		70,26	€/u	1u	70,26
Anell ruixador		500	€/u	1u	500
Sistemes de control	Medidor GROCHEK COMBO	209	€/u	1u	209
	Sonda temperatura	2,73	€/u	1u	2,73
	Rotlle d'aïllant tèrmic	28,9	€/u	1u	28,9
Muntatge	Costos de fabricació	40	€/h	40h	1600
Extres	Imprevistos			15%	1133,22
Personal	Enginyers	15	€/h	600	9000
TOTAL					17688,06 €

² Preus de l'acer extrets del fabricant GoodFellow. Disposa de certificació ISO 9001.

7. Estudi de l'impacte ambiental

Una de les principals raons per les quals aquest disseny té interès està en l'àmbit ambiental. Com ja s'ha mencionat diverses vegades, aquest procediment que varen estudiar Sang-Hyun Pyo, Molinari i León, és una possible alternativa al procés ACH per l'obtenció de metacrilat. Procés que utilitza substàncies tòxiques, que produeix força emissions de CO₂ (5.5 kg/kg), i genera una quantitat important de subproductes sense interès que s'han de disposar.

La fermentació que es duu a terme en aquest treball no utilitza cap altre substrat que el propi alcohol, de manera que en cap cas es genera CO₂ en el procés.

Així doncs les emissions degudes a aquest procés venen només per un camí, el consum energètic. Aquest consum es divideix entre el motor de 3 kW de l'agitació i el de 100 W del sistema d'aeració. Aquesta ha estat una de les raons, l'altra és econòmica, d'haver disminuït les revolucions de l'agitador.

Els dos motors treballen 8 hores al dia durant 225 dies l'any:

$$3kW \cdot 225dies \cdot 8h = 5400 kWh \text{ anuals}$$

El mix de producció bruta d'energia elèctrica general que l'Oficina Catalana del Canvi Climàtic recomana utilitzar un factor de 302g CO₂ per kWh d'energia consumida. (60)

$$5400kWh \cdot \frac{302g CO_2}{1kWh} \cdot \frac{1Kg}{1000g} = 1630.8 Kg CO_2 \text{ anuals}$$

En el nostre cas produïm anualment 350 kg, per tant:

$$\frac{1630.8 Kg CO_2}{350 Kg produïts} = 4.66 \frac{Kg CO_2}{Kg àcid}$$

Però en el nostre cas tenim una fermentació prèvia, d'aquesta fermentació no se n'han calculat les dimensions exactes però sí que podem fer una estimació per ser semblant a la fermentació principal (mateixes rpm, mateixa aeració, volum similar).

$$3kW \cdot 225 \cdot 48h = 32400 kWh \text{ anuals}$$

$$32400 \cdot \frac{302}{1000} = 9784.8 Kg CO_2 \text{ anuals}$$

I per tant el consum real de CO₂ per kilogram d'àcid produït seria:

$$\frac{1630.8 + 9784.8}{350} = 32.616 \frac{Kg CO_2}{Kg àcid}$$

Aquest valor és massa elevat, s'ha de tenir en compte que estem donant aquest procés com alternativa a un que emet 5.5 Kg/Kg produït, l'ACH. Les raons d'això són dues, una l'elevada potència que requereix el sistema d'agitació (3kW, 500 rpm) i l'altra a la baixa productivitat en general dels processos biològics (6.6 g/L en aquest cas).

Un cop vist aquest problema s'ha fet una petita recerca per veure com es podria millorar aquest valor. S'ha observat que en l'estudi sobre la mateixa fermentació feta el 2003 per Francesco Molinari (17) en que utilitzava el bacteri *acetobacter pasteurianus*, la productivitat era molt major (25g/L) i es requeria menor potència d'agitació (300rpm). Així doncs, és convenient mencionar que seria interessant aplicar aquest estudi com a model per a fer un bioreactor amb unes característiques semblants a les desenvolupades en aquest treball. Per una producció de 350 kg l'any requeriríem tant sols un fermentador de 62 L, de manera que obtindríem un important estalvi energètic al disminuir les dimensions de tots els components.

La decisió de prendre com a referència l'estudi de Sang-Hyun Pyo s'ha fet per les àmplies possibilitats que oferia com a ruta alternativa al procés ACH, i s'ha de dir que si bé resulta en una important quantitat de CO₂ emès en l'atmosfera, millora molt aquest procés en molts altres apartats. No es formen subproductes, no utilitza substàncies tòxiques, no utilitza àcid sulfúric i promou les reaccions biològiques com alternativa a el desenvolupament de productes derivats del petroli.

8. Organització del projecte

	jul-16		ago-16				sep-16				oct-16				nov-16				des-16				gen-17			
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26
Viabilitat i interès del projecte	Yellow																									
Investigació i documentació		Orange	Orange																							
Investigació: Les biorefineries				Light Green	Light Green																					
Investigació: Microorganismes i processos fermentatius						Green	Green																			
Investigació: Àcid 2-metil-3-hidroxiopropanoic								Dark Green	Dark Green																	
Investigació: Bioreactors										Dark Green	Dark Green															
Recerca d'estudis d'obtenció 3H2MPA											Red	Red														
Estudi de les opcions de disseny													Light Blue	Light Blue												
Elecció dels paràmetres de funcionament															Blue	Blue										
Disseny de les parts del bioreactor																	Dark Blue									
Dimensionat del bioreactor																			Light Orange	Light Orange						
Realització de plànols																					Orange	Orange				
Pla d'operacions i seguretat																							Brown	Brown		
Estudi econòmic																								Brown	Brown	
Estudi d'impacte ambiental																								Brown	Brown	
Redacció del projecte																										Dark Purple
Revisió general del projecte																										Light Blue
Presentació de la memòria																										Dark Blue
Defensa oral del projecte																										Dark Blue

Conclusions

L'objectiu d'aquest treball era el disseny en 3D i l'elaboració dels plànols d'un reactor de 350L per a produir 350 Kg d'àcid 2-metil-3-hidroxipropanoic per mitjà d'una fermentació microbiològica. Això s'ha fet utilitzant els programes Solidworks i eDrawings.

Primerament s'ha hagut d'escollir el bacteri a fer servir i per això s'ha fet una recerca bibliogràfica d'estudis sobre la temàtica concloent en els *Gluconobacter Oxydans*, usats en l'estudi fet per Sang-Hyun Pyo (1), que s'ha pres com a guia.

El tipus de reactor triat ha estat de tanc agitat (H=98cm i D=65cm) funcionant per lots, amb una fermentació de durada 8h i una productivitat de 6.6 g/L d'àcid. Per tal d'evitar la formació de vòrtex s'han usat 4 deflectors i, pel fet de ser una fermentació curta, s'ha usat un aïllant per a mantenir la temperatura adequada, desestimant la possibilitat d'usar una camisa tèrmica.

En l'estudi (1) es mencionen problemes d'inhibició pel substrat de manera que s'ha estudiat la cinètica microbiana. A (26) Edwards considera que el model matemàtic proposat per Haldane és el que millor descriu el fenomen i la seva expressió matemàtica és senzilla. Per aquest motiu és el model escollit.

L'elecció del sistema d'agitació s'ha basat en els estudis de Davis (54) i Armenante (57), decidint-nos per una doble turbina Rushton. L'estudi de Pyo feia ús d'una agitació de 1000 rpm però això portava a uns costos molt elevats de consum elèctric (22kW, 20€/fermentació) de manera que, anàlogament a (17), s'ha decidit rebaixar-les a 500 rpm i un motor de 3 kW.

Degut a la necessitat de contar amb una fermentació prèvia pel creixement del bacteri, s'ha dissenyat un pla d'operacions. Són necessaris dos operaris per dur a terme les 10 fermentacions setmanals necessàries per arribar a la producció 350 kg d'àcid anuals.

L'estudi econòmic ha resultat en un cost total del projecte de 13352,86€. En l'estudi de l'impacte ambiental s'han calculat les emissions de CO₂ per kilogram de producte; les emissions degudes a la fermentació principal no són molt elevades, 4.7, però considerant les degudes a la fermentació prèvia les emissions són molt majors, 32. Aquest últim valor, degut a la baixa productivitat i l'alta agitació, ens fa plantejar-nos la necessitat d'investigar alternatives per tal de reduir les emissions. Una bona manera seria seguir les indicacions d'un altre estudi fet per Molinari el 2003 (17) amb una altra bactèria, els *acetobacter pasteurianus*, en el qual assolí una productivitat molt major (25 g/L) i usà un agitació molt menor (300 rpm).

Bibliografia

1. **Sang-Hyun Pyo et al.** *A new route for the synthesis of methacrylic acid from 2-methyl-1,3-propanediol by integrating biotransformation and catalytic dehydration.* Green Chemistry, 2012, Vol. 14, p. 1942-1948.
2. **E. de Jong and G. Jungmeier.** *Industrial Biorefineries & White Biotechnology.* 2015. p. 3-33.
3. **B. Kamm, M. Kamm.** *Principles of biorefineries.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, Vol. 64, p. 137-145.
4. Diverses fotografies extretes del domini públic de Wikipedia. [En línia]. <http://www.wikipedia.org>. Consultat desembre 2016.
5. **M. Ringpfeil.** *Biobased Industrial Products and Biorefinery Systems—Industrielle Zukunft des 21.* 2002.
6. **Neste Oil.** *Neste Renewable Diesel (NEXBTL).* [En línia]. <https://www.neste.com/en/companies/products/fuels/neste-futura-diesel>. Consultat Novembre 2016.
7. **A. R. Womac, C. Igathinathane, P. Bitra, P. Miu, T. Yang, S. Sokhansanj, S. Narayan.** *Biomass Pre-Processing Size Reduction with instrumented Mills.* Minneapolis 2007. ASABE Annual International Meeting.
8. **Johan Sanders.** *Biorefinery, the bridge between Agriculture and Chemistry.* Gent 2005. International Conference on Renewable Resources & Biorefineries.
9. **Joseph J. Bozell and Gene R. Petersen.** *Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates.* Green Chemistry, 2010, Vol. 12, p. 525-728.
10. **Mark R. Wilkins and Hasan K. Atiyeh.** *Food and Industrial Bioproducts and bioprocessing.* Stillwater, Wiley-Blackwell, 2012. p. 195-199.
11. **M. J. Waites, N. L. Morgan, J. S. Rockey, G. Higton.** *Industrial Microbiology: An introduction.* London, Blackwell Science, 2010.
12. **Andreas Liese and Murillo Villela Filho.** *Production of fine chemicals using biocatalysis.* Current Opinion in Biotechnology, 1999, Vol. 10, p. 595-603.
13. **Arthur I. Aronson and Yechiel Shai.** *Why Bacillus thuringiensis insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action.* FEMS Microbiology letters, 2001,

Vol. 195, p. 1-8.

14. **H. Svarstad, H. C. Bugge and S. S. Dhillon.** *From Norway to Novartis: Cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime.* Biodiversity and Conservation, 2000, Vol. 9, p. 1521-1541.

15. **D. Dobie and J. Gray.** *Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*.* Archives of Disease in Childhood, 2004, Vol. 89, p. 74-77.

16. **World Health Organization.** *Laboratory biosafety manual.* Ginebra. World Health Organization publications, 2004.

17. **F. Molinari, R. Gandolfi, R. Villa, E. Urban and A. Kiener.** *Enantioselective oxidation of prochiral 2-methyl-1,3-propanediol by *Acetobacter pasteurianus*.* Tetrahedron: Asymmetry, 2003, Vol. 14, p. 2041-2043.

18. **R. León, D. M. F. Prazeres, P. Fernandes, F. Molinari and J. M. S. Cabral.** *A Multiphase Hollow Fiber Reactor for the Whole-Cell Bioconversion of 2-Methyl-1,3-propanediol to (R)- β -Hydroxyisobutyric Acid.* Biotechnology Progress, 2001, Vol. 17, p. 468-473.

19. **Hiromichi Ohta, Hatsuki Tetsukawa, and Naoko Noto.** *Enantiotopically Selective Oxidation of α,ω -Diols with the Enzyme Systems of Microorganisms.* The Journal of Organic Chemistry, 1982, Vol. 47, p. 2400-2404.

20. **A. Gupta, V. K. Singh, G. N. Qazi and A. Kumar.** **Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications.* Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, Vol. 3, p. 445-456.

21. **Kenneth C. Fugelsang.** *Wine Microbiology.* Fresno. Springer Science+Business Media Dordrecht, 1997.

22. **Sue Macauley, Brian McNeil, and Linda M. Harvey.** *The Genus *Gluconobacter* and its Applications in Biotechnology.* Critical Reviews in Biotechnology, 2001, Vol. 21, p. 1-25.

23. **W. Olijve and J. J. Kok.** *An Analysis of the Growth of *Gluconobacter oxydans* in Chemostat Cultures.* Archives of Microbiology, 1979, Vol. 121, p. 291-297.

24. **P. F. Stanbury, A. Whitaker and S. J. Hall.** *Principles of Fermentation Technology.* Burlington. Butterworth and Heinemann, 2003.

25. **Jacques Monod.** *The Growth of Bacterial Cultures.* Annual Review of Microbiology, 1949, Vol. 3, p. 371-394.

26. **Victor H. Edwards.** *The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics.* Biotechnology and Bioengineering, 1970, Vol. 12, p. 679-712.
27. **A. N. Collins, G. N. Sheldrake and J. Crosby.** *Chirality in Industry: The commercial Manufacture and Applications of Optically Active Compounds.* Manchester. John Wiley & Sons, 1992.
28. **William G. Robinson, Roy Nagle, Bimal K. Bachhawat, Floyd P. Kupiecki, and Minor J. Coon.** *Coenzyme a thiol esters of isobutyric, methacrylic and betha-hydroxyisobutyric acids as intermediates in the enzymatic degradation of valine.* The Journal of Biological Chemistry, 1957, Vol. 224, p. 1-11.
29. **M Midland, N Nguyen.** *Asymmetric Synthesis of γ -Lactones. A Facile Synthesis of the Sex Pheromone of the Japanese Beetle.* Journal of Organic Chemistry, 1981, Vol. 46, p. 4107-4108.
30. **Wilson H. De Camp.** *The FDA Perspective on the Development of Stereoisomers.* Chirality, 1989, Vol. 1, p. 2-6.
31. **Loring Coes, Jr.** *Manufacture of methacrylic acid.* Du Pont. Estats Units. US2379625. 3-07-1945.
32. **William G. Robinson and Minor J. Coon.** *Synthesis of Malonic Semialdehyde, B-Hydroxypropionate and B-Hydroxyisobutyrate.* Methods in ezimology, 1963, Vol. 6, p. 549-553.
33. **William Choy, Philip Ma and Satoru Masamune.** *Enantioselective synthesis of b-hydroxyisobutyric acid: a useful synthon in the synthesis of polypropionate-type natural products.* Tetrahedron Letters, 1981, Vol. 22, p. 3555 - 3556.
34. **Charles T. Goodhue and James R. Schaeffer.** *Preparation of L (+) P-Hydroxyisobutyric Acid by Bacterial Oxidation of Isobutyric Acid.* Biotechnology and bioengineering, 1971, Vol. 13, p. 203-214.
35. **J. Hasegawa, M. Ogura, S. Hamaguchi, M. Shimazaki, H. Kawaharada, and K. Watanabe.** *Stereospecific conversion of isobutyric acid to D-betha-hydroxyisobutyric acid by microorganism.* Journal of fermentative technology, 1981, Vol. 59, p. 203-208.
36. **Y. Lee, W. K. Hong, Y. B. Hwang, C. H. Kim, E. S. Choi, S. K. Rhee and Y. H. Park.** *Production of D- β -Hydroxyisobutyric Acid from Isobutyric Acid by *Candida rugosa*.* Fermentation and bioengineering, 1996, Vol. 81, p. 79-82.
37. **C. H. Kim, W. K. Hong, I. Y. Lee, E. S. Choi, S. K. Rhee.** *Enhanced production of D- β -hydroxyisobutyric acid through strain improvement.* Journal of Biotechnology, 1999,

Vol. 69, p. 75-79.

38. **I. Y. Lee, C. H. Kim, B. K. Yeon, W. K. Hong, E. S. Choi, S. K. Rhee, Y. H. Park, D. H. Sung, W. H. Baek.** *High production of D- β -hydroxyisobutyric acid from methacrylic acid by *Candida rugosa* and its mutant.* *Bioprocess Engineering*, 1997, Vol. 16, p. 247-252.

39. **Hiromichi Ohta and Hatsuki Tetsukawa.** *Enantiotopically selective oxidation of 1,3-diols with a microorganism.* *Chemistry Letters*, Vol. 8, 1979, p. 1379-1380.

40. **M. Shimazaki, J. Hasegawa, K. Kan, K. Nomura, Y. Nose, H. Kondo, T. Ohashi and K. Watanabe.** *Synthesis of Captopril starting from an Optically Active β -Hydroxy Acid.* *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1982, Vol. 30, p. 3139-3146.

41. **D. A. Evans, C. E. Sacks, W. A. Kleschick and T. R. Taber.** *Polyether Antibiotics Synthesis. Total Synthesis and Absolute Configuration of the Ionophore A-23187.* *Journal of American Chemical Society*, 1979, Vol. 101, p. 6789-6791.

42. **N. Cohen, W. F. Eichel, R. J. Lopresti, C. Neukom, and G. Saucy.** *Synthetic Studies on (2R,4'R,8'R)- α -Tocopherol. An Approach Utilizing Side Chain Synthons of Microbiological Origin.* *Journal of Organic Chemistry*, 1976, Vol. 41, p. 3505.

43. **Quirico Branca and Albert Fischli.** *A chiral economic synthesis of (R)- and (S)-muscone using the cyclofragmentation of epoxysulfones.* *Helvetica Chimica Acta*, 1977, Vol. 60, p. 925-944.

44. **Robert Wilczynski and Jamie Jerrick Juliette.** *Methacrylic Acid and Derivatives.* *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* John Wiley & Sons, 2003.

45. **William Bauer, Jr.** *Methacrylic Acid and Derivatives.* *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* Weinheim. Wiley-VCH, 2005.

46. **Universitat de Barcelona.** *Apunts Enginyeria Bioquímica i Biotecnologia.* Barcelona, 2016.

47. **TEESING.** [En línia]. <https://www.teesing.com/en/page/product-information/filters/spargers>. Consultat Gener 2017.

48. **E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, B. Dahhou, S. Sanchez, A. L. Demain and A. R. Allman.** *Fermentation Microbiology and Biotechnology.* Boca Raton. Taylor & Francis Group, 2012.

49. **J. De Ley and K. Kersters.** *Oxidation of Aliphatic Glycols by Acetic Acid Bacteria.* *Bacteriological Reviews*, 1964, Vol. 28, p. 164-180.

50. **E. B. Chain, S. Paladino, D. S. Callow, F. Ugolini and J. Van der Sluis.** *Studies on aeration-I.* Bulletin of World Health Organization, 1952, Vol. 6, p. 73-97.
51. **Mott corporation.** *Bio-Fermentation Study. Mott Laboratory Test Report.* Farmington. [En línia]. <http://mottcorp.com/products/biofermentation-sparger>. Consultat Desembre 2016.
52. **Kurt Eyer.** *Development of an Industrial Biotechnologyl Proces.* [En línia]. <http://moodle.epfl.ch/pluginfile.php/1519946/course/overviewfiles/ScaleUP.pdf?forcedownload=1>. Consultat Desembre 2016.
53. **Dynamix Agitators INC.** [En línia] <http://www.dynamixinc.com/baffled-by-baffles>. Consultat Desembre 2016.
54. **Ryan Z. Davis.** *Design and Scale-Up of Production Scale Stirred Tank Fermentors.* Utah State University, Logan, 2010.
55. **Paulo Rogério Meneses de Sousa.** Escalonamento de tanques condicionadores utilizados na flotação de apatita. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
56. **A. W. Nienow and M. D. Lilly.** *Power Drawn by Multiple Impellers in Sparged Agitated Vessels.* Biotechnology and Bioengineering, 1979, Vol. 21, p. 2341-2345.
57. **Piero M. Armenante and Gwo-Ming Chang.** *Power Consumption in Agitated Vessels Provided with.* Industrial and Engineering Chemistry Research, 1998, Vol. 37, p. 284-291.
58. **James A. Mueller, William C. Boyle and H. Johannes Pöpel.** *Aeration: Principles and Practice.* Boca Raton. CRC Press, 2002.
59. **Sigma-Aldrich Corporation.** [En línia] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z672998?lang=es®ion=ES>. Consultat Gener 2017.
60. **Oficina Catalana del Canvi Climàtic.** *Guia pràctica per al càlcul d'emissions de gasos amb efecte d'hivernacle (GEH).* [En línia]. http://canviclimatic.gencat.cat/web/.content/home/reduex_emissions/guia_de_calcul_demissions_de_co2/160411_Guia-practica-calcul-emissions_sense-canvis_CA.pdf. Consultat Gener 2017.