

Producción de Poli(β -hidroxibutirato) utilizando Glicerol como Fuente de Carbono

Ramos F; Estrada V; Marcelo A; Villar M y Diaz M
Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET),
Departamento de Ingeniería Química, UNS, Camino "La Carrindanga" Bahía Blanca,
Argentina
fdramos@plapiqui.edu.ar

Resumen

En este trabajo se realizó un dimensionamiento preliminar, empleando un simulador comercial, de una planta de producción de poli(β -hidroxibutirato), PHB, mediante el empleo de microorganismos y a partir de glicerol como materia prima. El proceso consta de tres sectores: a) purificación de la materia prima, en donde la corriente de glicerol se despoja del metanol que pudiese contener; b) fermentación, sección en la cual se produce el crecimiento a partir de un inóculo y la producción de PHB empleando un microorganismo aislado en el laboratorio (*Bacillus megaterium*). Además en este punto se implementa un modelo de la cinética de reacción para *B. megaterium* utilizando un enfoque de parametrización vectorial. c) separación del biopolímero, donde se produce la ruptura celular y se logra la separación y purificación del producto.

Palabras clave: *Bacillus megaterium*; modelado; poli(β -hidroxibutirato).

Poly(β -hydroxybutyrate) Production using Glycerol as a Carbon Source

Abstract

In this work, we carry out a design and a preliminary dimensioning of a poly(β -hydroxybutyrate) (PHB) plant, based on microorganisms and using glycerol as raw material. The process comprises three main sectors: a) raw material purification, where the glycerol stream (coming from a biodiesel production plant) is purified by eliminating methanol; b) fermentation, where the growth of the microorganisms (*Bacillus megaterium*) takes place and the production of PHB occurs. In this point, a model of the specific growth rate for *B. megaterium* is implemented within a control vector parameterization approach; c) biopolymer separation, which includes the extraction process, where cellular walls are exposed to lyses and a purified product, is obtained.

Key words: *Bacillus megaterium*; modeling; poly(β -hydroxybutyrate).

Introducción

La producción mundial de biodiesel se ha duplicado desde 10,5 billones de litros en 2007 hasta 22,5 billones de litros en 2012. Países americanos como Estados Unidos, Argentina y Brasil forman parte del grupo que lidera mundialmente la producción de este biocombustible (Renewables global status report, 2013).

El biodiesel es producido principalmente a partir de la transesterificación de aceites vegetales con metanol (alcohol de cadena corta) catalizada por un ácido o una base dando como producto secundario el glicerol. Aunque este compuesto en estado puro es utilizado en diversas industrias tales como la farmacéutica, alimenticia, cosmética, etc., la sobreproducción acoplada a la producción de biodiesel hace que la oferta de glicerol sea mayor que la demanda.

La producción de poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) mediante microorganismos constituye una alternativa a la producción de polímeros a partir de combustibles fósiles. Asimismo, la producción actual de poli(β -hidroxibutirato), PHB, a gran escala utiliza sustratos que resultan costosos y/o que compiten con la alimentación humana. En estos procesos, el costo de la materia prima puede alcanzar hasta un 50% del costo de producción. Consecuentemente, es importante la utilización de fuentes de carbono más económicas, tales como glicerol, que es el principal subproducto de la producción de biodiesel (Cámara argentina de recursos renovables, 2010).

Los organismos Gram positivos pueden ser utilizados con total confianza en la producción de PHAs destinados a aplicaciones biomédicas debido a que estos organismos, a diferencia de los Gram negativos, carecen de lipopolisacáridos (LPS) que contienen endotoxinas en su membrana celular, lo cual causa reacciones inmunogénicas cuando son puestas en contacto directo con seres humanos.

De todas las bacterias Gram positivas, el género *Bacillus* sp., además de tener la capacidad de acumular PHB, puede hacerlo a partir de fuentes de carbono simples como glicerol. El inconveniente respecto a este tipo de microorganismos es la implementación industrial debido a la formación de esporas, cualidad que poseen cuando se encuentran en condiciones de cultivo desfavorables, las mismas que estimulan la formación de PHAs intracelulares en esta cepa (López, 2011).

Por esta razón, el objetivo de este estudio es desarrollar un modelo para el diseño óptimo de una planta de producción de PHB mediante el empleo de microorganismos empleando glicerol como materia prima. El proceso consta de tres sectores: purificación de la materia prima (glicerol), fermentación y extracción del producto (PHB) (Posada *et al.*, 2010).

Materiales y métodos

En el proceso de producción de PHB a partir de glicerol se pueden distinguir tres sectores principales: purificación de la materia prima (glicerol), fermentación y extracción y purificación del producto (Posada *et al.*, 2011). Debido a análisis previos de productividad de diferentes cepas de microorganismos Gram positivos, se escogió el *Bacillus megaterium* para ser inoculado y utilizarlo como productor del biopolímero de interés.

En la primera etapa del proceso, una corriente de glicerol con metanol, agua y restos de triglicéridos junto con trazas de catalizador provenientes del proceso previo de producción de biodiesel, dependiendo de la procedencia de la materia prima, ingresa a este sector. Dicha corriente se calienta para separar posteriormente el metanol y parte del agua que ingresa con la misma en un evaporador instantáneo o flash. A continuación, la corriente líquida se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl) en un reactor, previo enfriamiento, con el fin de neutralizar el catalizador (NaOCH_3) no utilizado proveniente del proceso previo de producción de biodiesel. Luego de realizada la reacción de neutralización, se eliminan las trazas de cenizas con la ayuda de una centrifuga. La corriente libre de sólidos insolubles se enfría haciéndola circular por un nuevo intercambiador para el ingreso de la misma a un decantador donde se lava la corriente con agua de proceso para obtener glicerol libre de sales y sólidos.

Finalmente, el agua y las cantidades remanentes de metanol se remueven por evaporación en un flash y una columna de destilación, para obtener como producto final de esta primera etapa de proceso una corriente de glicerol con las especificaciones necesarias para poder brindar a los microorganismos la fuente de carbono necesaria en su crecimiento.

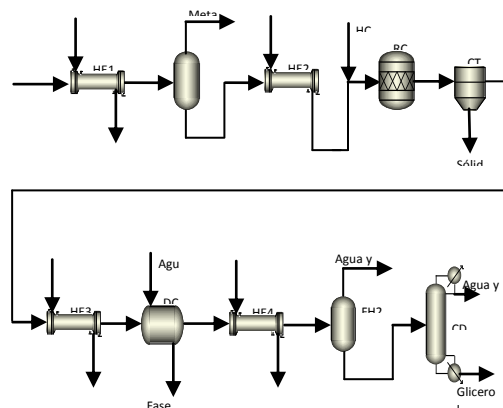


Figura 1. Esquema del proceso de purificación de glicerol. HE: Intercambiadores de calor, FH: flashes, RC: reactor de neutralización, CT: centrifuga, DC: decantador, CD: columna de destilación.

En el proceso de fermentación la corriente de glicerol purificada se somete a un proceso de esterilización (compresión y calentamiento), previo al ingreso a los biorreactores donde se encuentra el medio de cultivo con los microorganismos.

Antes del ingreso del glicerol al primer fermentador se lleva la corriente de proceso a condiciones de presión y temperatura ambiente, haciéndola pasar por una válvula y un intercambiador.

En el primer fermentador, se lleva a cabo el crecimiento bacteriano, mientras que en el segundo se produce la acumulación de PHB en los microorganismos luego de

someterlos a una limitación de alguno de sus nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, magnesio, potasio o azufre.

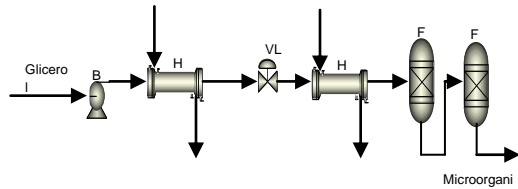


Figura 2. Esquema del proceso de fermentación. BM: bomba, HE: intercambiadores de calor, VL: válvula, FR: fermentadores.

Finalmente, en el sector de extracción y purificación, la corriente proveniente del proceso de fermentación, se mezcla con formato de metilo y luego ingresa a un digestor donde se rompen las paredes celulares para liberar el PHB.

Los restos insolubles de las paredes celulares que se generaron se eliminan con una centrífuga. La corriente rica en producto, agua y solvente se envía a un flash, logrando de esta manera la separación y obtención del biopolímero purificado(Ramos *et al.*, 2013).

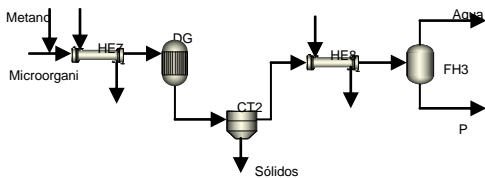


Figura 3. Esquema del proceso de extracción de PHB. HE: intercambiadores de calor, DG: digestor, CT: centrífuga, FH: flash

Los procesos descritos se han implementado en el simulador comercial ASPEN, para una producción de PHB de 200 tn/año. Se lleva a cabo la

optimización de uno de los sectores de la planta de producción de PHB sujeto al modelo matemático riguroso del proceso, particularmente el correspondiente a la purificación de glicerol, donde se busca maximizar el caudal de materia prima purificado con el fin de lograr un mayor beneficio en la utilización de este subproducto de la industria del biodiesel. Se formula el siguiente problema de optimización:

$$\text{Máx } Z = f(x) \quad (1)$$

s.t.

$$g(x,y) \leq 0 \quad (2)$$

$$h(x,y) = 0 \quad (3)$$

$$x^L \leq x \leq x^U \quad (4)$$

Donde Z es la función objetivo que se busca maximizar para lograr finalmente obtener en este sector el mayor caudal de glicerol purificado con los menores costos operativos.

Esto último se traduce en la minimización de los caudales de corrientes auxiliares (agua de enfriamiento o calentamiento) para el proceso, como así también en las dimensiones de equipos; $h(x,y)$ es el modelo matemático del proceso que se está optimizando, el cual incluye modelos rigurosos de columnas de destilación, tanques flash, intercambiadores de calor, etc.; $g(x,y)$ corresponde a restricciones operativas y de calidad de producto, que incluyen recuperación de glicerol en cada una de las etapas de separación, la pureza del glicerol a la salida del sector de purificación, así como diferencias mínimas de temperaturas entre las corrientes de los intercambiadores de calor.

Las variables de optimización, x e y , incluyen temperaturas de operación de los separadores flash, presión de operación de las columnas de destilación, y caudales de las corrientes de servicios. Las predicciones termodinámicas se llevan a cabo con un modelo de coeficiente de actividad para la fase líquida (NRTL) y una ecuación de estado cúbica (RK-Soave) para la fase vapor. Dicho modelo provee una representación confiable del equilibrio de fases y propiedades termodinámicas.

El proceso de fermentación y el de ruptura celular para la liberación del biopolímero se modela en base a rendimientos reportados en la bibliografía. Finalmente, se calculan las dimensiones de cada uno de los equipos, sobredimensionándolos con un factor de 1,4.

Por otra parte se formula un modelo dinámico de producción de PHB (Ecs. 5-11) para poder, a través de una estimación de parámetros, utilizarlo en la predicción del comportamiento de una cepa de *Bacillus megaterium* en la producción de PHB.

El biorreactor se representa por una serie de ecuaciones diferenciales y algebraicas como se muestra a continuación, las cuales junto con restricciones sobre las variables de estado se resuelven en gPROMS para obtener los valores adecuados de ciertos parámetros con el fin de adaptar el modelo del biorreactor presentado a una nueva situación en donde la producción de PHB se efectúa

bajo diferentes condiciones. Los parámetros cinéticos que no fueron estimados, se reportan en el trabajo de López *et al.*, (2010).

La tasa específica de crecimiento (López *et al.*, 2010) puede ser expresado como:

$$\mu = \mu_m \frac{S_1^{n_1}}{K_S 1^{n_1} + S_1^{n_1}} \frac{S_2^{n_2}}{K_S 2^{n_2} + S_2^{n_2}} \left(1 - \left(\frac{S_1}{S_{m1}}\right)^{a_1}\right) \left(1 - \left(\frac{S_2}{S_{m2}}\right)^{a_2}\right) \quad (5)$$

La biomasa total (X) se representa como:

$$X = P + R \quad (6)$$

Donde R es la biomasa residual y P es el producto intracelular obtenido.

Los balances de masa para la biomasa residual (R) y el producto (P) como el consumo de la fuente de nitrógeno y carbono se representan como:

$$\frac{dR}{dt} = \left(\mu - \frac{1}{V}(F_1 + F_2)\right) R \quad (7)$$

$$\frac{dP}{dt} = (K_1 \mu - K_2) R - \frac{P}{V}(F_1 + F_2) \quad (8)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -(\alpha \mu + \gamma) R + \frac{F_1 S_{o1}}{V} - \frac{S_1}{V}(F_1 + F_2) \quad (9)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{xs2}} + m_{s2}\right) R + \frac{F_2 S_{o2}}{V} - \frac{S_2}{V}(F_1 + F_2) \quad (10)$$

El biorreactor varía su volumen de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{dV}{dt} = F_1 + F_2 \quad (11)$$

Donde α y γ son valores relacionados con el crecimiento y mantenimiento celular respectivamente. F_1 y F_2 son la alimentación de las fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, S_{o1} y S_{o2} son las concentraciones de cada una de estas corrientes de alimentación. Y_{xs2} es el rendimiento de biomasa total respecto a la

fuelle de nitrógeno y ms^2 es una constante que representa el consumo de la fuente de nitrógeno para el mantenimiento celular. Los datos experimentales que son utilizados para la estimación dinámica de parámetros se obtuvieron del trabajo presentado por López *et al.*, (2012).

Resultados

Se efectúa el dimensionamiento de los equipos que componen la planta de obtención de PHB, en el mismo entorno de optimización. Las Tablas 1 a 3 muestran los valores de las dimensiones de los equipos utilizados en las tres etapas del proceso: purificación de glicerol, fermentación y extracción y purificación de PHB.

Tabla 1. Dimensiones de equipos del sector de purificación de glicerol.

Equipos	Diámetro (m)	Altura o Largo (m)	Área (m ²)
Reactor	0,50		0,20
Centrífuga	0,11	0,47	0,10
Columna de destilación	0,14		0,02
Evaporadores	0,26		0,05
	0,26		0,03
Decantador	0,31	0,93	0,08
Intercambiadores de calor	0,16	1	0,54
	0,07	0,50	0,13
	0,07	1	0,23
	0,13	1	0,47
Tanque de agua	3,60	7,20	9,86
Tanque de glicerol	2,38		4,45

Tabla 2. Dimensiones de equipos del sector de fermentación.

Equipos	Diámetro (m)	Altura o Largo (m)	Área (m ²)
Fermentadores	2,05		3,30
	2,10		3,50
Intercambiadores de Calor	1,08	2	7,57
	1,39	3,50	16,92
Tanque de agua	4,64		16,91

Tabla 3. Dimensiones de equipos del sector de extracción de PHB.

Equipos	Diámetro (m)	Altura o Largo (m)	Área (m ²)
Fermentadores	2,05		3,30
	2,10		3,50
Intercambiadores de Calor	1,08	2	7,57
	1,39	3,50	16,92
Tanque de agua	4,64		16,91

Los valores óptimos de los parámetros estimados se pueden observar en la tabla 4. Las figuras 4, 5, 6 y 7 muestran los perfiles de las principales variables del modelo y los datos experimentales.

Tabla 4. Valores obtenidos a partir de estimación de parámetros.

Nombre del parámetro	Valor del parámetro
a_1	3,0091
a_2	0,435637
n_1	6,59444
n_2	1,68921
$\mu(h^{-1})$	1,73982
Y_{xs2}	0,431125

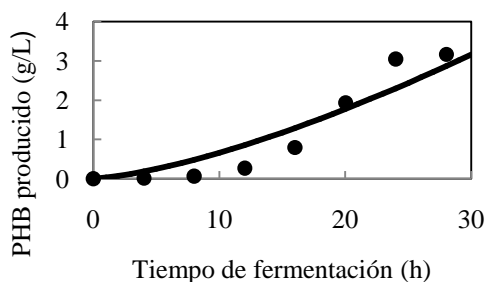


Figura 4. Variación del PHB (P) producido en función del tiempo de fermentación empleando *Bacillus megaterium*.
Datos experimentales, (----) Modelo propuesto

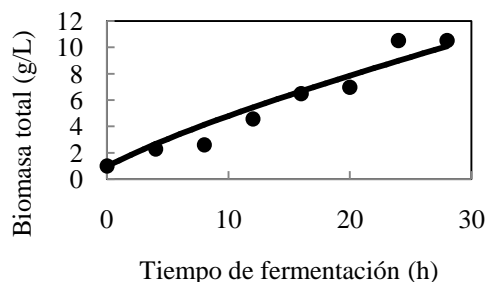


Figura 7. Variación de la biomasa total (X) en función del tiempo de fermentación empleando *Bacillus megaterium*.
Datos experimentales, (----) Modelo propuesto

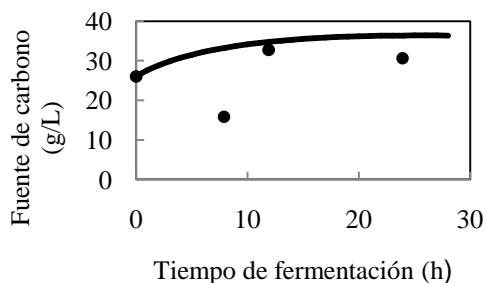


Figura 5. Variación de la fuente de carbono (S1) en función del tiempo de fermentación empleando *Bacillus megaterium*.
Datos experimentales, (----) Modelo propuesto

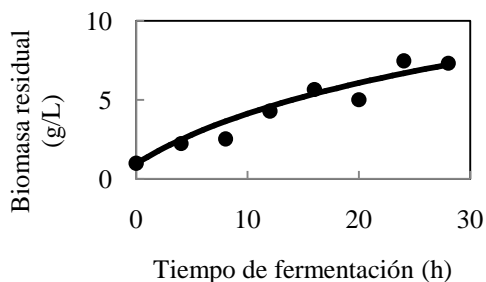


Figura 6. Variación de la biomasa residual (R) en función del tiempo de fermentación empleando *Bacillus megaterium*.
Datos experimentales, (----) Modelo propuesto

Discusión

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el modelado, análisis de sensibilidad y optimización de una planta de producción de poli(β -hidroxibutirato) mediante fermentación empleando glicerol como sustrato. El proceso es de creciente interés para la producción de biopolímeros, en particular empleando materias primas que no compitan con la alimentación. El modelo se ha implementado en el simulador comercial Aspen Plus y se ha modificado para luego trabajar en modo optimización. Asimismo, se han dimensionado los equipos involucrados en el proceso. Los resultados obtenidos a partir de los estudios de sensibilidad realizados brindan un aporte indispensable en el momento de reducir las numerosas variables de optimización que existen en equipos complejos.

Por otro lado, a través de una estimación de parámetros se pudo adaptar un modelo de cinética de crecimiento obteniendo

resultados muy satisfactorios en los perfiles de fuente de carbono, PHB producido, biomasa residual y biomasa total.

Esto último ofrece una contribución significativa en el estudio de producción de PHB utilizando *B. megaterium*, ya que posibilita la realización de una optimización dinámica con el objetivo de definir las condiciones operativas que maximizan la producción en el biorreactor reduciendo de esta manera los costos de los experimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) y UNS (Universidad Nacional del Sur) por el apoyo financiero.

Referencias

Aspen Plus version 7.2, Aspen Technology, Inc., Cambridge, Massachusetts, USA, 2010.

Cámara argentina de recursos renovables. Renovables.

Recuperado de :

<http://www.cader.org.ar/informes-y-estudios/evolucion-del-mercado-de-biocombustibles-en-la-argentina.htm> [citado el 29 de Marzo de 2012].

López Jiménez, J. A (2011) Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (PHB). Bahía Blanca, Argentina. Universidad Nacional del Sur.

López, J. A., Bucalá, V. & Villar, M. A (2010) Application of Dynamic Optimization Techniques for Poly(Beta-hydroxybutyrate) Production in a Fed-Batch Bioreactor. *Industrial & engineering chemistry research*, 49, 1762-1769.

López, J. A., Naranjo J. M., Higueta J. C., Cubitto M. A., Cardona C. A. & Villar M. A (2012) Biosynthesis of PHB from a Nex Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 17, 250-258.

Posada, J. A., Cardona, C. A. & Rincón, L. E.(2010) Sustainable biodiesel production from palm using in situ produced glycerol and biomass for raw bioethanol. *32nd Symposium on biotechnology for fuels and chemicals*. Clearwater Beach, Estados Unidos, Abril.

Posada, J. A., Naranjo, J. M., López, J. A., Higueta, J. C. & Cardona, C. A (2011) Design and analysis of PHB production processes from crude glycerol, *Process biochemistry*, 46, 310-317.

Ramos, F. D., Estrada, V., Diaz, M. S. & Villar, M. A (2013) Optimización de la producción de Poli(β -hidroxi-butirato) a partir de Glicerol. *13° Simposio argentino de informática*. Córdoba, Argentina, Septiembre

Renewables Global Status Report, 2013 Update, p. 30. Recuperado de : http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR/2013/GSR2013_lowres.pdf

Ulrich, G. D. & Vasudevan, P. T. (2004) Short-Cut Equipment Design. En: Chemical Engineering Process Design and Economics: A *Practical Guide* (Ulrich y Vasudevan Eds.). McGraw-Hill, Durham, 89-324.