



“Una red de centros tecnológicos para desarrollar una biorefinería a base de algas”

EFA037/15

E.3.2.1 Tecnología optimizada de cultivo y producción de biomasa a escala planta piloto

Actividad 3_3.2

05/02/2018

Título de Informe	Tecnología optimizada de cultivo y producción de biomasa a escala planta piloto.
Version	0
Responsable del Entregable	CENER
Actividad	Actividad 3.2
Autor	Mercedes Munárriz
Colaborador/es	All partners
Referencia	EFA037/15
Programa	Programa INTERREG V-A España-Francia-Andorra POCTEFA 2014-2020
Fecha de comienzo del Proyecto	01/06/2016
Duración	36 meses
Jefe de Filas	NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

RESUMEN

Este informe recoge los resultados correspondientes a la actividad 3.2., cuyo objetivo consistió en validar el rendimiento productivo del PDC establecido en la actividad 3.1 a escala de planta piloto (40-100-1000 litros).

El desarrollo de la actividad se inició con una serie de experimentos de crecimiento en fermentador de 40L dirigidos a validar el procedimiento inicial para el cultivo heterotrófico de la microalga *Chlorella protothecoides* que permitiera la obtención de biomasa oleaginosa a escala de planta piloto. En una etapa posterior se adaptó este protocolo para validar el rendimiento productivo a mayor escala realizando ensayos de crecimiento en fermentadores de 100L y 1000 L.

El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (**POCTEFA 2014-2020**). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra. Su ayuda se concentra en el desarrollo de actividades económicas, sociales y medioambientales transfronterizas a través de estrategias conjuntas a favor del desarrollo territorial sostenible.

INDICE

RESUMEN	2
1 INTRODUCCIÓN.....	4
2 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD	4
2.1 Ensayos de producción y ajuste en bioreactor de 40-100 L producción de 10 kg de biomasa fresca	4
2.2 Ensayos de producción y ajuste en bioreactor de 1m3 producción de 10 kg de biomasa fresca	7
3 CONCLUSIONES.....	8

1 INTRODUCCIÓN

2 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD

2.1 Ensayos de producción y ajuste en bioreactor de 40-100 L producción de 10 kg de biomasa fresca

Los primeros ensayos de producción de biomasa oleaginosa en planta piloto se realizaron a partir del PDC (procedimiento detallado de cultivo) desarrollado por NEIKER en la actividad 3.1 y transferido a CENER, para la producción heterotrófica de microalgas a escala inicial de 40L.

Tras la obtención de los primeros kilos y viendo la posibilidad de realizar el escalado en otro de los bioreactores de mayor volumen disponibles en planta, se acordó, junto con el resto de socios, realizar los siguientes ensayos en bioreactor de 100 litros (figura 1)



Figura 1. Bioreactor de 100L y 40 L planta CB2G (Centro Biocombustibles 2º generación Aoiz).

Fuente: CENER

Ensayos en bioreactor 40L

A partir del PDC entregado por NEIKER, desarrollado hasta bioreactor de 5 litros de capacidad con 3 litros de volumen de cultivo, donde se alcanzó una concentración de biomasa de **17-20 g peso seco/litro** con un contenido lipídico cercano al **50%** y en un **periodo máximo de 96 horas de cultivo**, se realizarón las adaptaciones necesarias en el fermentador de 40 litros y se estableció el protocolo de tren de inóculos para el escalado en planta piloto, con el objeto de reproducir los resultados de productividad alcanzados a escala de laboratorio.

Al ser los tiempos del tren de inóculos largos se preparó un cronograma en el que se fueron solapando los ensayos para aprovechar mejor los tiempos.

En total se realizaron 4 ensayos de ajustes de parámetros y de producción en el último trimestre de 2016, en la escala de 40 litros con 30 litros de volumen de cultivo.

Procedimiento de cultivo

La fase productiva se inició añadiendo a los 27 litros de medio de cultivo de microalgas, 3 litros de inóculo generado en el laboratorio de planta según PDC.

Una vez inoculado el microorganismo se dejó crecer durante 45 horas, tiempo en el que se realizaron tres pulsos de Dextrosa conforme la glucosa iba siendo consumida.

El cultivo fue cosechado entre las 90-96 horas.

Para la cosecha se utilizó una centrifuga marca Westfalia de capacidad 1 kg en el tambor de recogida (ver figura 2).



Figura 2. Microalgas recogidas en el tambor de la centrifuga

Fuente: CENER

La biomasa fresca fue caracterizada y enviada al socio CATAR-CRITT para que realizara la extracción del aceite de la biomasa producida.

En la tabla 1 se recogen los datos de producción de los 2 lotes productivos.

En ambos lotes se consiguieron los rendimientos esperados, en relación a los gramos de alga seca producidos por litro de cultivo (17-20 g ps/l) y el contenido lipídico esperado (cercano al 50%).

LOTE 1 Y 2- BIOREACTOR 40L				
Datos producción	lote 1	lote 2	Total	Unidades
kg alga (pf)	1,6	1,7	3,3	kg
Humedad	59,4	61,71	-	%
kg alga (ps)	0,65	0,61	1,26	kg
%aceite	52,7	55,3	-	%
g aceite teóricos	342,3	338,7	681,1	g
g alga (ps) /l	21,7	20,33	-	g/l

Tabla 1. Datos de producción de los 2 lotes productivos

Fuente: CENER

Ensayos en bioreactor 100L

Para la realización de los ensayos en bioreactor de 100L NEIKER y CENER realizaron una adaptación del procedimiento de cultivo PDC empleado para la obtención de biomasa de *C. protothecoides* en reactor de 30 litros a un reactor de 80 litros de capacidad.

Se planteó realizar un proceso en tres etapas:

Etapa 1: se generó un inóculo de 4 litros mediante Fedbatch con NH₄OH

Etapa 2: se preparó el bioreactor de 100 litros a un volumen final de 40 litros empleando la solución nutritiva indicada en el PDC y se inóculo con los 4 litros de cultivo generado en fedbatch. Se dejó crecer alrededor de 24 horas.

Etapa 3: Tras el periodo anterior se incorporó al bioreactor 50 litros de solución nutritiva concentrada preparada para un volumen final de 90 litros. Y se inició la incorporación de glucosa a demanda durante los siguientes 3 días. Según el comportamiento del proceso en 40 litros se estimaron las incorporaciones a las 24h, 40h y a las 52 horas.

En la tabla 2 se recogen los datos de producción de los 2 lotes productivos.

Al igual que en los ensayos en bioreactor de 40 litros, la biomasa fue centrifugada y caracterizada, previo a su envío al socio CATAR-CRITT quien realizaría la extracción del aceite y el posterior reparto de las fracciones extraídas a los socios implicados en el resto de actividades de valorización del aceite extraído y de la biomasa residual.

LOTE 1 Y 2- BIOREACTOR 100L				
Datos producción	lote 1	lote 2	Total	Unidades
kg alga (pf)	3,9	5,17	3,3	kg
Humedad	62	68,3	-	%
kg alga (ps)	1,48	1,64	3,12	kg
%aceite	52	38	-	%
g aceite teóricos	769,6	623,2	1392,8	g
g alga (ps) /l	16,4	18,2	-	g/l

Tabla 2. Datos de producción de los 2 lotes productivos

Fuente: CENER

En el caso de estos ensayos la productividad obtenida fue un poco inferior a la conseguida en los lotes anteriores en los que se consiguieron 20 g de peso seco de microalga por litro.

Y en el caso del porcentaje lipídico el primero de los lotes sobrepasó el 50 % quedando el segundo lote en el 38%.

Ambos cultivos fueron enviados a CATAR para su extracción.

Con esta tanda de ensayos en 40-100 litros se consiguió rebasar el primer objetivo productivo de 10 kg de biomasa de microalgas fresca (en total se enviaron para su extracción 12.3 kg de biomasa), con una concentración de biomasa, un contenido celular de aceite y un tiempo de producción comparable a los obtenidos a escala laboratorio.

2.2 Ensayos de producción y ajuste en bioreactor de 1m³ producción de 10 kg de biomasa fresca

Para la 2º tanda de producción de biomasa fresca se acuerda, con el resto de socios, realizar el escalado en un bioreactor de mayor volumen disponible también en las instalaciones del CB2G de CENER.

Atendiendo a las productividades obtenidas en anteriores ensayos, se decide realizar el escalado en un bioreactor de 1 m³ con un volumen de trabajo de 400 litros que permita obtener en un único lote los 10 kg de biomasa fresca acordada para la segunda tanda de ensayos.

A partir del procedimiento de cultivo (PDC) empleado para la obtención de biomasa de *C. protothecoides* en reactor de 100 litros, NEIKER y CENER realizan la adaptación para un reactor de 1 m³ de capacidad con un volumen de trabajo de 400 litros.

El nuevo protocolo se dividió en 3 etapas:

Etapla 1.- Activación de la cepa

Etapla 2.- Generación de un tren de inóculos (0.4 y 40 litros)

- El 1º inóculo (0.4 litros) se genera mediante el cultivo en batch con agitación orbital
- El 2º inóculo (4 litros) se obtiene mediante el cultivo en Fed-batch nitrógeno en bioreactor
- El 3º inóculo (40 litros) se obtiene mediante cultivo Batch en bioreactor 100 l

Etapla 3: Proceso de producción de cultivo de 400 litros en un bioreactor de 1 m³ para la producción de biomasa.

En esta última etapa se preparó una solución nutritiva para el fermentador de 1 m³ a un volumen de 360 litros y se inoculó con los 40 litros de cultivo generados en la etapa 2.

A partir de este momento se siguió un protocolo de incorporación de glucosa a demanda durante 3 días. Revisando el comportamiento del proceso en reactor de 100 L se estableció también la pauta de incorporación: 10 g/l a las 24 horas, 20 g/l a las 40 horas y 10 g/l a las 52 horas.

Tras 72 horas el cultivo se paró y se llevó a cabo la separación de la fracción sólida y líquida por centrifugación.

En la tabla 2 se recogen los datos de producción de este lote productivo en 1 m³.

LOTE 1 - BIOREACTOR 1M3		
Datos producción	lote 1	Unidades
kg alga (pf)	16,6	kg
Humedad	65	%
kg alga (ps)	5,81	kg
%aceite	50	%
g aceite teóricos	2905	g
g alga (ps) /l	15	g/l

Con esta tanda de ensayos en 1m³ se consiguió rebasar el segundo objetivo productivo de 10 kg de biomasa de microalgas fresca (en total se enviaron para su extracción 16.6 kg de biomasa).

Este ensayo presentaba también una concentración de biomasa de 15 g/l de alga en peso seco, un poco menor al obtenido en escalados anteriores en 40- 100 L, aunque también el tiempo de cultivo en este caso fue menor 72 horas siendo los cultivos anteriores de 92 horas.

En el caso del contenido celular de aceite se acercó al objetivo del 50%.

Los 16,6 kg de microalgas recogidas fueron enviadas después de su caracterización al socio CATAR-CRIT, para proceder a la extracción y reparto de biomasa residual.

3 CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de la actividad se validó el rendimiento productivo del procedimiento detallado de cultivo heterotrófico para la especie *C.protothecoides* que permite alcanzar una concentración de biomasa de 17-20 gPSL⁻¹ en un periodo de cultivo de 4 días, siendo la productividad de dicho proceso de 4.6 gPSL⁻¹d⁻¹ a escala de 100 Litros.

El rendimiento productivo para la escala 1m³ es algo menor con un valor de 15 gPSL⁻¹ en un periodo de cultivo de 3 días.

La biomasa obtenida mediante el proceso anterior presenta un contenido superior al 50% de materia grasa en forma de FAMES, lo que supone una productividad de 2.5 g FAMESL⁻¹d⁻¹ derivada del proceso de cultivo.

Se ha validado la tecnología de cultivo desarrollada hasta escala de 1m³ y se ha producido la biomasa de microalgas que ha servido como materia prima principal, para el desarrollo del resto de actividades del proyecto.