

Evaluación de la producción de gases en la fermentación acetobutílica

ALBERTO DUARTE TORRES

Ingeniero Químico. MSc. Profesor Asociado. Facultad de Ingeniería.
Universidad Nacional de Colombia.

JOHN F. ALARCÓN GRANOBLES

Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia.

EDGAR R. PIÑEROS FORERO

Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia.

INTRODUCCIÓN

Los costos crecientes de las materias primas provenientes del petróleo, base de los procesos de síntesis de acetona y butanol, han originado un renovado interés por los procesos fermentativos. Estos procesos dejaron de aplicarse en 1930 por sus desfavorables condiciones económicas en comparación con los procesos sintéticos. Un ejemplo fué la planta de Illinois (EE.UU), con 96 fermentadores de 200 m³ y un consumo diario de 25.000 bultos de maíz (9).

El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, después de considerar que el país importa anualmente alrededor de 2500 toneladas de butanol y el 80 % de la acetona consumida, inició en 1987 un programa de desarrollo de la fermentación acetobutílica a partir de melazas de caña. De acuerdo con el estudio de prefactibilidad económica para la producción de butanol y acetona por fermentación, de Serrano y Pinzón (10), los gases constituyen un 83 % de los ingresos totales recibidos por ventas, mientras los solventes, etanol, butanol y acetona, sólo un 16 %, razón por la cual es necesaria la evaluación de los gases producidos en la fermentación.

1. EQUIPO DE FERMENTACIÓN

El equipo utilizado es un «*Microferm Fermentor*» de la serie MF-100, fabricado por la compañía *New*

Brunswick Scientific (7), diseñado para cultivo continuo y por lotes, y equipado con sistemas de control de pH, temperatura y velocidad de agitación. El fermentador está ubicado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional.

Las condiciones anaeróbicas son alcanzadas mediante la alimentación de nitrógeno gaseoso a través de un filtro empacado con lana de vidrio; un filtro similar se utiliza para evacuar los gases producidos por la fermentación. La agitación es producida por un impulsor de paletas planas y cuatro pantallas deflectoras. El control de la temperatura se realiza mediante la adición de agua fría o caliente, según el caso. El agua entra por una de las pantallas y sale por la pantalla opuesta. Los gases producidos en la fermentación pasan por un condensador ubicado en la tapa del fermentador.

2. FERMENTACIÓN ACETOBUTÍLICA

2.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO.

Las fermentaciones se realizan con medio fermentativo (Tabla 1), a partir de un preinóculo preparado con medio similar.

La preparación de medio se realiza mediante el siguiente procedimiento:

Tabla 1.
Composición del medio empleado en la fermentación, (11).

Miel de caña	130	g
K ₂ HPO ₄	1,8	g
PABA (ácido p-aminobenzoico)	3	mg
Extracto de levadura	5	g
Fuente de minerales	4	ml
Agua, en cantidad suficiente para...	900	ml

Fuente de minerales:

NaMo ₄ .2H ₂ O	2,4	g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,7	g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24	g
MgSO ₄ .H ₂ O	1	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5	g
H ₂ SO ₄ concentrado	28	ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,7	g
Agua, cantidad suficiente para...	1000	ml

La melaza se disuelve en agua destilada y se centrifuga a 2000 rpm. durante 20 minutos, con el propósito de eliminar los sólidos suspendidos. Simultáneamente se disuelve K₂HPO₄ en agua destilada. Entonces se adicionan al sobrenadante, extracto de levadura, ácido p-aminobenzoico y minerales. Los recipientes con el medio son sellados con papel de aluminio y esterilizados en el autoclave a 103,388 kPa (15 psig) durante 20 minutos. Finalmente se mezclan los fosfatos con la miel y los nutrientes en condiciones estériles.

2.2 ACTIVACIÓN DE LA CEPAS.

La activación de la cepa se realiza mediante el siguiente procedimiento:

Se esterilizan en el autoclave diez tubos de ensayo, preferiblemente roscados, con sus tapas a medio ajustar. Posteriormente, en un área estéril se adiciona a los tubos medio vegetativo hasta la mitad de su volumen. La composición de este medio es similar a la del medio fermentativo (Tabla 1), pero con 80 g de miel de caña, en lugar de 130 g. Entonces, se agrega a cada tubo, perfectamente agitado, medio de cultivo con esporas de *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 silvestre, en una proporción de una parte de esporas y nueve de medio puro. Para garantizar condiciones anaeróbicas, antes de tapar los tubos se vierte parafina fundida en cada uno. Al solidificar, la parafina forma un tapón sobre la superficie, que impide el

paso del oxígeno (aire). Finalmente los tubos son sellados.

Los tubos perfectamente cerrados, después de ser introducidos durante 2,5 minutos en un recipiente con agua en ebullición y luego en otro recipiente con agua fría, son llevados a una incubadora a 37 °C. Veinticuatro horas más tarde aproximadamente, y como consecuencia de la producción de gases, la parafina se levanta de la superficie del medio, indicando la activación de la cepa. En este caso puede apreciarse un cambio de color del medio, desde café hacia amarillo. Por el contrario, si después de 30 horas no se observa producción de gases, la cepa debe someterse a un nuevo choque térmico.

Una vez activada la cepa, debe mantenerse en estas condiciones mediante repiques cada 24 horas. Los repiques consisten en un cambio de medio con esporas a los tubos, en la proporción de 1 parte de esporas y 9 de medio puro. Antes de cambiar el medio, los tubos son agitados hasta lograr homogeneidad. Entonces, después de retirarles una buena cantidad de medio fresco y adicionarles parafina fundida, son tapados y transportados a la incubadora. Los repiques se hacen cada 24 horas, tiempo requerido para alcanzar la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, caracterizada por una gran producción de gases.

2.3 PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO.

El volumen disponible del fermentador es 12 litros, distribuidos en 10,8 litros de medio puro y 1,2 litros de medio con células activas (preinóculo). Estas cantidades corresponden a una relación volúmenes de 9:1.

Inicialmente se preparan en un matraz 120 ml de medio vegetativo; la composición de este medio es similar a la del medio fermentativo (Tabla 1), pero con 80 g de miel de caña en lugar de 130 g. Posteriormente el matraz con medio vegetativo es inoculado con la cepa activa contenida en uno de los tubos.

Entonces, en un matraz de 2 litros se preparan 1,1 litros de medio fermentativo (Tabla 1) y se procede a inocularlo con 120 ml del matraz con células en su fase exponencial de crecimiento. Dumar y Granados (5), establecieron un tiempo de 20 horas para lograr la densidad adecuada para inocular el medio de fermentación. El medio se calienta en el fermentador hasta la temperatura óptima de crecimiento celular (37°C), antes de hacer la inoculación.

Tabla 2.
Condiciones de fermentación, (1).

Volumen del medio de fermentación	12 litros
Volumen preinóculo: volumen de medio	1:9
Temperatura	37 °C.
Velocidad de agitación, (4,14)	200 rpm.
Flujo de N ₂ (para anaerobiosis)	2,1 litros/minuto
Tiempo de burbujeo de N ₂	15 minutos
Volumen de cada muestra líquida	40 ml.

2.4 CONDICIONES DE LA FERMENTACIÓN.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de las condiciones de la fermentación.

2.5 TOMA DE MUESTRAS.

2.5.1 Muestras líquidas.

Para la toma de la muestra líquida se usa un tubo de vidrio (Figura 2) de 150 ml de capacidad, provisto

de tres entradas. Después de conectar la línea B del tubo con el fermentador, se hace vacío con una jeringa de 50 ml a través de la línea de gas. La tapa del tubo es un filtro empacado con lana de vidrio. Una vez tomada la muestra, se sella con una pinza la línea B conectada con el fermentador. El tubo descrito también se puede utilizar para inocular el fermentador a través de la línea A. Las muestras líquidas son analizadas (1) para determinarles pH, concentración de células, concentración de glucosa y solventes (1,6).

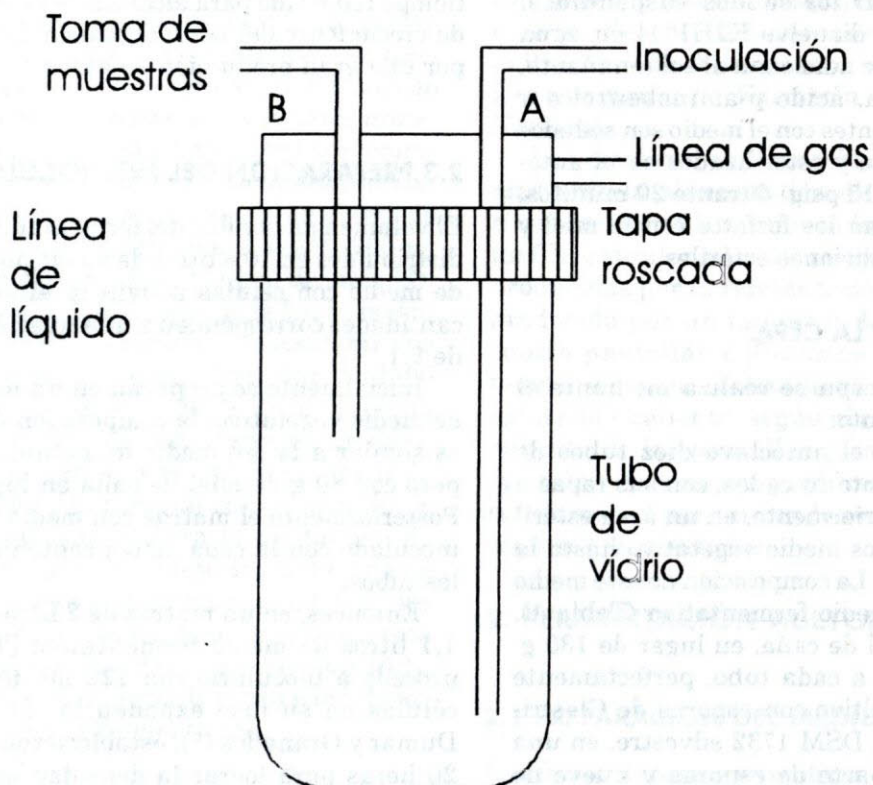


FIGURA 2.
Tubo para la toma de muestras líquidas (1)

2.5.2 MUESTRAS GASEOSAS.

Las muestras gaseosas se usan para analizar la composición de los gases producidos durante la fermentación. Antes de tomar la muestra se determina el caudal de gas. Para tomar la muestra se cierra la salida de gas hacia los medidores de caudal mediante la válvula de dos vías (Figura 1). Entonces, mediante la válvula de dos canales, se conecta la botella tomamuestra con la atmósfera y se abren las dos válvulas de la botella.

Después de llenar la botella, a través del embudo, con agua acidulada [20 % p/v de NaCl y 0,5 % p/v de ácido cítrico, con el propósito de minimizar la cantidad de gas carbónico disuelto en el líquido (3)], se cambia la posición de la válvula de dos canales y se conecta la botella con la línea de gas. Entonces, se desplaza el embudo hacia abajo para llenar la botella mediante desplazamiento de líquido (esta operación se realiza a la misma velocidad de producción de gases en el fermentador).

Tan pronto como el gas desaloja el líquido de la botella, mediante una adecuada manipulación del embudo, deben equilibrarse los niveles del

improvisado manómetro formado con la manguera flexible que conecta la botella con el embudo. Cuando se logra el equilibrio se cierran la válvulas de la botella, se cambia la posición de la válvula de dos niveles, se desaloja el líquido presente en el embudo y se reemplaza la botella tomamuestra. El análisis de las muestras se realiza mediante cromatografía de gases (8,12).

2.6 DETERMINACIÓN DEL CAUDAL DE GAS.

De acuerdo con Beloshitskii, Lanina y Simulik (2), el método de la burbuja es uno de los más precisos para la determinación de pequeños caudales de gas entre 2 y 200 ml/minuto. Es un sistema sencillo (Figura 1), si se considera que sólo requiere una bureta calibrada, un cronómetro, solución jabonosa y una conexión en T para alimentar el gas a medir. Como el volumen y la concentración de los gases dependen de la temperatura y la presión, estas dos cantidades se mantienen constantes durante la fermentación con el propósito de obtener datos comparativos. Además, en el análisis de una mezcla de gases se tiene en cuenta que cada uno de los componentes de la mezcla ocupa el volumen total y

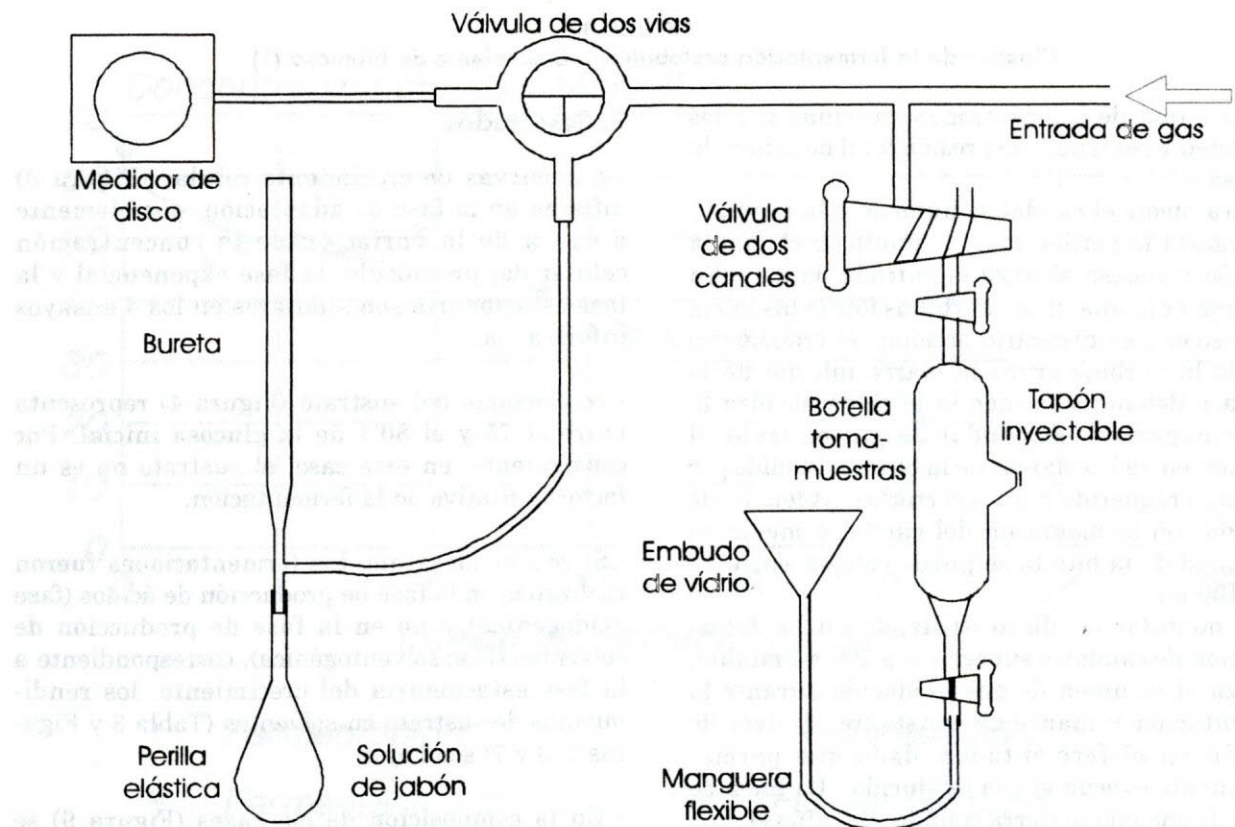


FIGURA 1.
Sistema de medición de flujo y toma de muestras gaseosas (1)

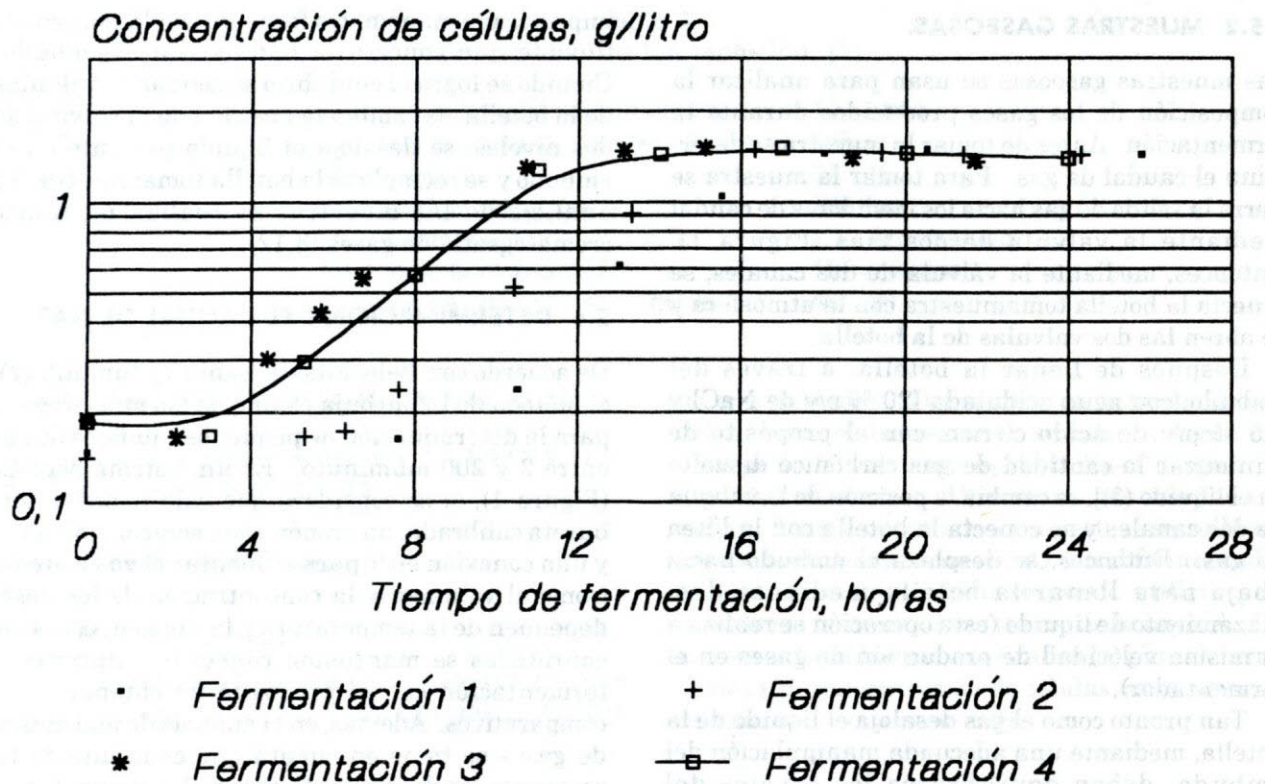


FIGURA 3.
Cinética de la fermentación acetobutílica. Crecimiento de biomasa (1)

que la suma de las presiones ejercidas por los componentes es igual a la presión total de la mezcla gaseosa.

Para medir el caudal se humedece la bureta y se presiona la perilla hasta el punto en el cual la solución jabonosa alcanza la entrada de gas. En este momento una de las burbujas formadas inicia su ascenso y es necesario accionar el cronómetro cuando la burbuja cruza la marca inferior de la bureta y detenerlo cuando la burbuja alcanza la marca superior. El caudal de gas es igual al volumen entre las marcas de la bureta dividido por el tiempo requerido para recorrerlas. Además, de acuerdo con la magnitud del caudal a medir, la capacidad de la bureta se puede escoger entre 10 ml y 100 ml.

El medidor de disco utilizado en la determinación de caudales superiores a 100 ml/minuto, totaliza el volumen de gas producido durante la fermentación y mantiene constante el nivel de presión en el fermentador, dado que permanentemente evacúa el gas producido. La línea de salida de gas solo se cierra cuando se evalúa el flujo con el medidor de burbuja o cuando se recogen muestras gaseosas (Figura 1).

3. Resultados

- Las curvas de crecimiento celular (Figura 3) difieren en la fase de adaptación, posiblemente a causa de la variación de la concentración celular del preinóculo; la fase exponencial y la fase estacionaria son similares en los 4 ensayos informados.

- El consumo del sustrato (Figura 4) representa entre el 75 y el 80% de la glucosa inicial. Por consiguiente, en este caso, el sustrato no es un factor limitativo de la fermentación.

- Si se considera que las fermentaciones fueron realizadas en la fase de producción de ácidos (fase acidogénica) y no en la fase de producción de solventes (fase solventogénica), correspondiente a la fase estacionaria del crecimiento, los rendimientos de sustrato en solventes (Tabla 3 y Figuras 5, 6 y 7) son bajos.

- En la composición de los gases (Figura 9) se alcanzan valores de la relación (moles CO_2)/(moles H_2) menores que 1. Estos valores coinciden con los

Tabla 3. Rendimiento del sustrato en solventes y gases, (1).

Fermentación	Y _{S/S}	P	CO ₂	H ₂	Y _{G/S}
Observaciones:	A	B	C	D	E
1	0,084	0,17	0,58	0,42	0,1808
2	0,095	0,20	0,54	0,46	0,1772
3	0,064	0,14	0,72	0,28	0,2653
4	0,100	0,18	0,70	0,30	0,2960

A: Y_{S/S}: Rendimiento de sustrato en solventes, expresado como gramos/litro de solventes por cada g/l de glucosa consumida.

B: P: Productividad, expresada como la concentración de solventes producidos en gramo/litro por cada hora de fermentación.

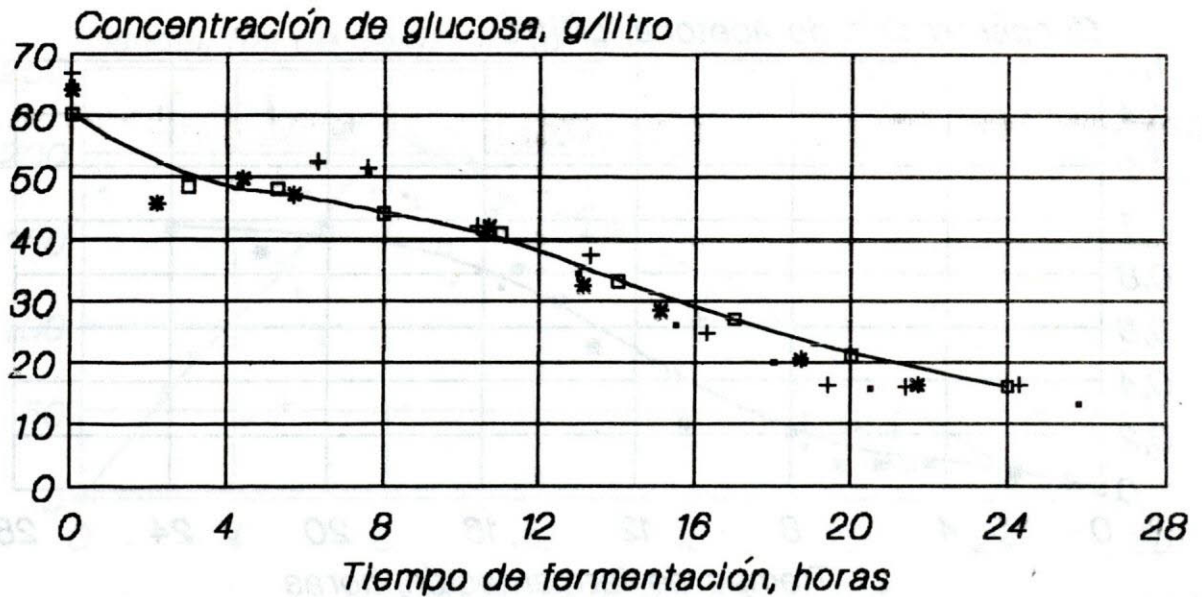
C: Fracción molar de CO₂.

D: Fracción molar de H₂.

E: Y_{G/S}: Rendimiento de sustrato en gases, expresado como gramos de gas producido por gramo de glucosa consumida.

resultados de Yerushalmi y Volesky (14). Además, se observa que esta relación es siempre mayor que 1 en la etapa final de la fase exponencial de crecimiento. La fracción molar de CO₂ (Tabla 3) varía entre 0,72 y 0,54 y la correspondiente a H₂ entre 0,46 y 0,28. Estos valores concuerdan con los informados por Walton y Martin (13).

- El rendimiento de glucosa en gases (Figura 9 y Tabla 3) varía entre 18 y 29,6 gramos de gas producido por cada 100 g de glucosa consumida. Estos resultados confirman la importancia de la producción de gases en el estudio de factibilidad técnico-económica de la fermentación acetobutílica.



- Fermentación 1
- + Fermentación 2
- * Fermentación 3
- Fermentación 4

FIGURA 4.

Cinética de la fermentación acetobutílica. Consumo del sustrato (1)

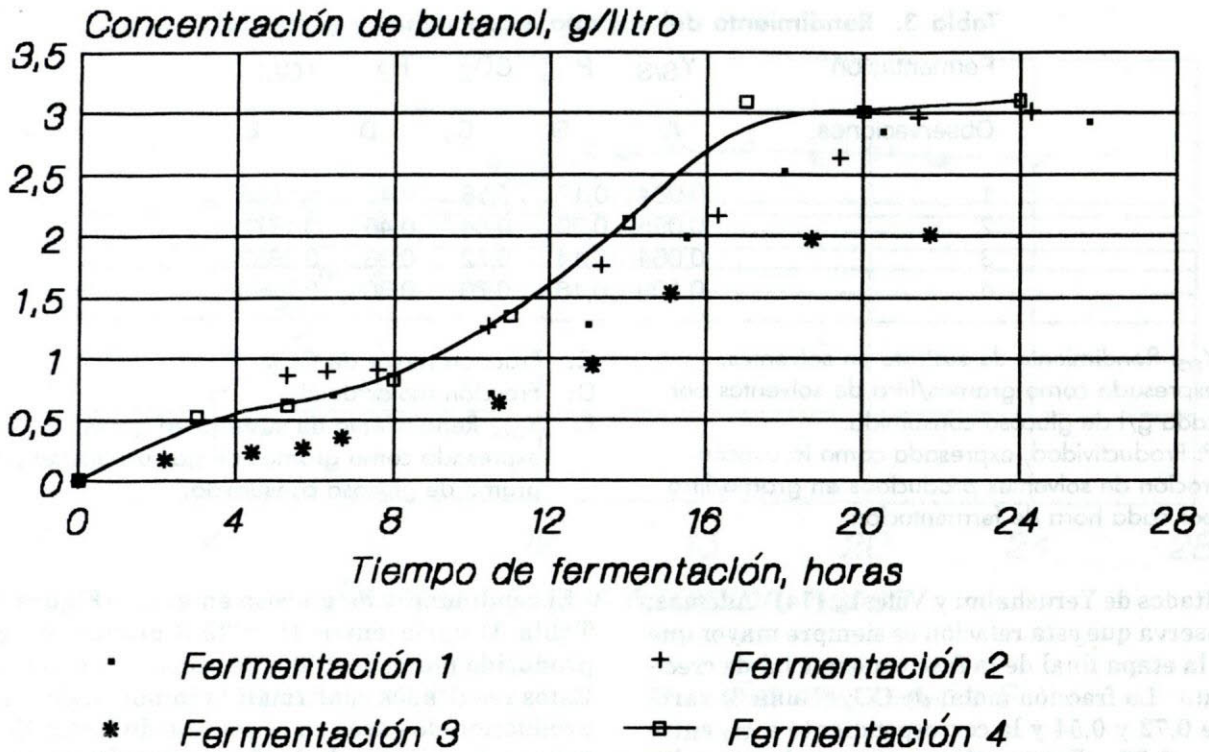


FIGURA 5.
Cinética de la fermentación acetobutílica. Producción de solventes: butanol (1)

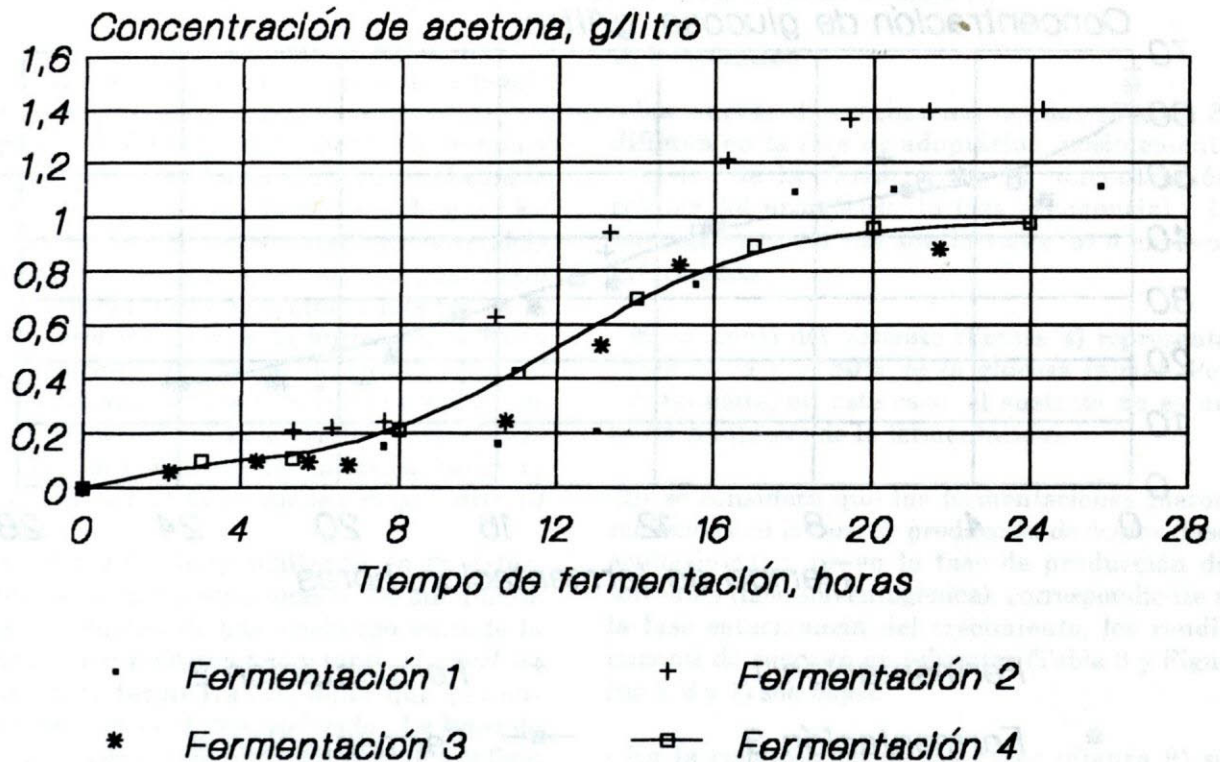


FIGURA 6.
Cinética de la fermentación acetobutílica. Producción de solventes: acetona (1)

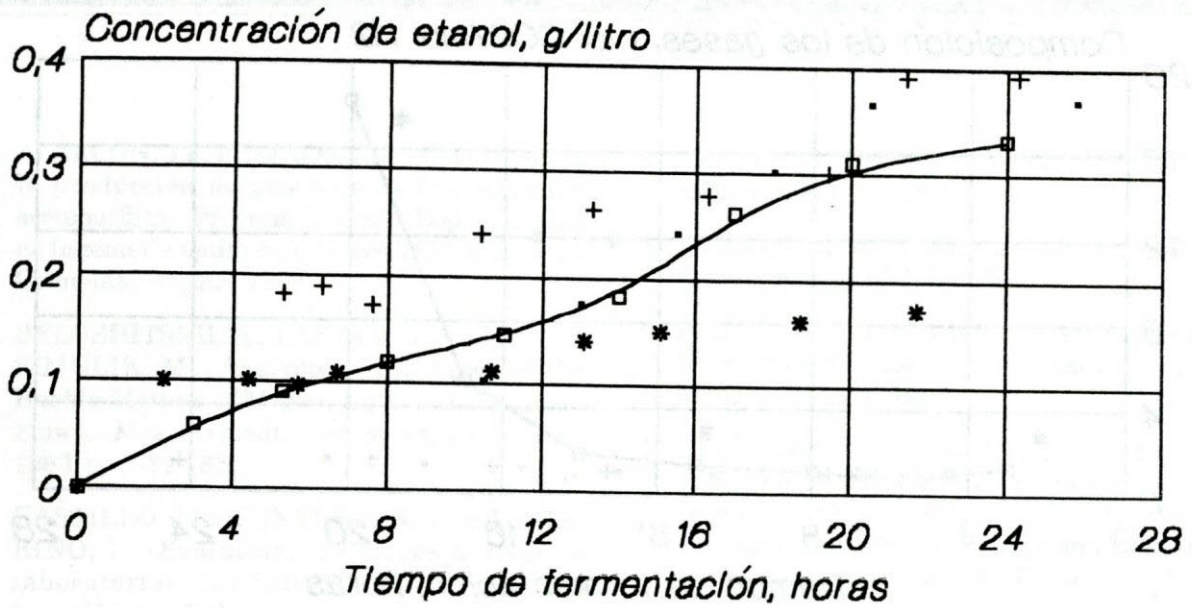


FIGURA 7.

Cinética de la fermentación acetobutílica. Producción de solventes: etanol (1)

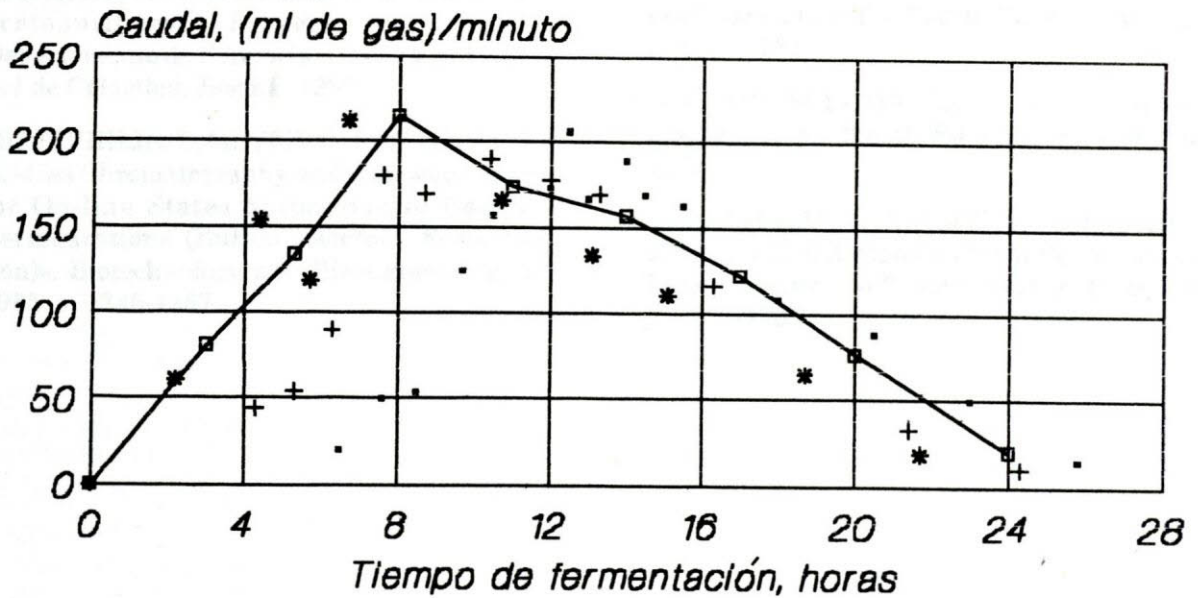


FIGURA 8.

Cinética de la fermentación acetobutílica. Producción de gases: H₂ y CO₂ (1)

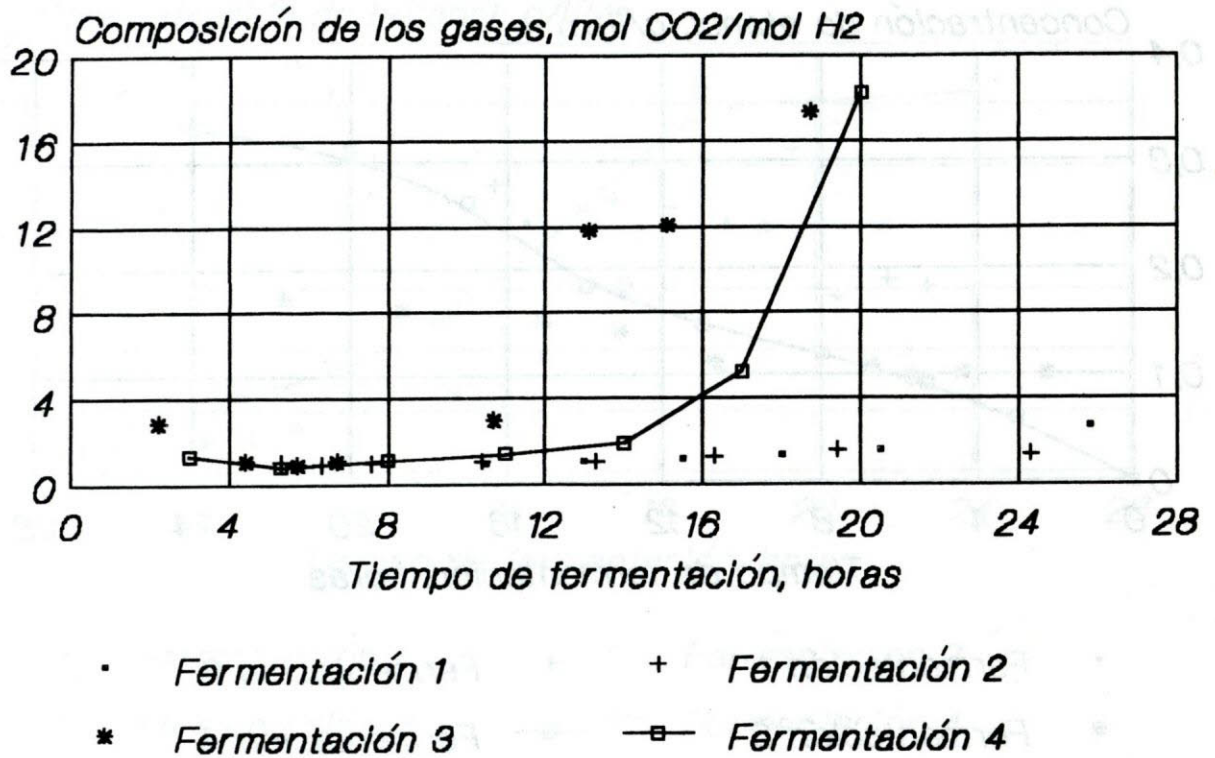


FIGURA 9.
 Composición de los gases producidos en la fermentación acetobutílica.
 Relación molar: (moles CO₂)/(moles H₂), (1)

BIBLIOGRAFÍA

1. ALARCON, J.F, PIÑEROS, E.R. «Evaluación de la producción de gases en la fermentación acetobutílica». Proyecto de grado. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1989.
2. BELOSHITSKII, A., LANINA, G., and SIMULIK, M. «Analysis of the Error of the Bubble Method of Measuring Small Gas Mass Flow». *Measurements Techniques*, 26, 9, Sep., 1983. pp. 780-783.
3. CASTILLO, M., CONTRERAS, J. y MAGARIÑO, L. «Evaluación de biogas a nivel de laboratorio». Instituto de Investigaciones Tecnológicas, Industrial y de Normas Técnicas (ITINTEC). Lima-Perú. Dic., 1980.
4. DOREMUS, M., LINDEN, J., y MOREIRA, A. «Agitation and Pressure Effects on Acetone-Butanol Fermentation». *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 6, 1985. p. 852-860.
5. DUMAR, R., GRANADOS, J., «Estandarización de técnicas para la evaluación de la fermentación acetobutílica». Proyecto de Grado. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1987.
6. McLAUGHLIN, I., MEYER, C., PADOUTSAKIS, E. «Gas Chromatography and Gateway Sensors for On-line States Estimation of Complex Fermentations (Butanol-Acetone Fermentation)». *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1985. p. 1246-1257.
7. NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC SALES CO. «Manual de Operación».
8. PERKIN-ELMER. «Manual de Operación». Cromatógrafos SIGMA 300.
9. PRESCOTT, S., DUNN, C., «Microbiología Industrial», 2ª Edición. Editorial Aguilar S.A. Madrid, España. 1962.
10. SERRANO, G., PINZON, J., «Estudio de prefactibilidad económica para la producción de acetona y butanol por fermentación». Proyecto de Grado, Departamento Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1987.
11. SILVA, E. «Estandarización y optimización de un medio de cultivo para fermentación acetobutílica por el sistema de cultivo con WWTinuo». Proyecto de Grado, Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1989.
12. STAMBUK, J., «Manual práctico de cromatografía de gases». The Perkin Elmer Corp., 1970, p. 1277-1281.
13. WALTON, M.T., MARTIN, J.L., «Principles of biochemistry». Worth Publishers. New York, 1982.
14. YERUSHALMI, L., VOLESKY, B. «Importance of Agitation in Acetona-Butanol Fermentation». *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 9, 1985, p. 1277-1305.