

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FERMENTACION ACETOBULITICA

*Cruz, L.; Cabrera, N.; Montoya, D.; Moreno, N.; Buitrago, G.
Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. IBUN
A.A. 14490. Fax: 3681615. E-mail: ibun@bacata.ups.unal.edu.co*

RESUMEN

En este trabajo se estudia el efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento, el consumo de sustrato y la producción de solventes en la fermentación acetobutilica, FABE. Se obtuvieron las temperaturas más apropiadas para las fases acidogénica y solventogénica y la influencia de la edad del inóculo sobre el crecimiento celular y la producción de solventes.

INTRODUCCION

La aplicación de la ingeniería a los procesos biotecnológicos, especialmente el estudio de variables de proceso es fundamental para obtener un desarrollo tecnológico competitivo. En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura sobre la fermentación y su influencia sobre variables biológicas (consumo de sustrato, producción de solventes), así como el efecto del cambio de la temperatura sobre la fermentación acetobutilica, proceso en el cual se obtienen productos de alto valor industrial como la acetona y el butanol.

METODOLOGIA

Se empleo la cepa de *Clostridium acetobutylicum* (C. a) IBUN10, suministrada por el cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). Las esporas fueron preservadas en solución isotónica estéril a 4 °C. El medio de activación fué RCM Merck. La composición del medio de producción es: 130 g de melaza, 5 g de extracto de levadura, 1.8 g de K_2HPO_4 , 2.5 g de $(NH_3)_2SO_4$, 3 mg de Paba y 1 mililitro de stock de minerales. El pH inicial del medio se ajustó a 6.1 unidades de pH. Las condiciones anaeróbicas se logran burbujeando CO_2 estéril antes de inoculación durante 10 min.

La biomasa se cuantificó mediante densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer, Modelo 35 Jr. La concentración de azúcares se determinó mediante el método enzimático glucosaoxidasa Merck. Los solventes producidos se cuantifican por cromatografía de gases método head-space, en un cromatografo Varian 3400, columna Chromosorb 101, utilizando el detector de ionización de llama.

El programa experimental contempló evaluar las variables de la fermentación (crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de productos) a diferentes niveles de temperatura. Ya que la fermentación presenta dos fases (acidogénica y solventogénica) fué necesario realizar dos grupos de fermentaciones, variando primero la temperatura de la fase acidogénica (25, 29, 31, 33, 35, 37 y 39 °C) y luego la temperatura de la fase solventogénica (24, 27, 30 y 35 °C). En el primer caso se mantuvo la temperatura de la fase solventogénica en 33 °C y en el segundo se mantuvo la temperatura de la fase acidogénica en el valor óptimo hallado del primer grupo de ensayos.

Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado en matraces de 500 ml dentro de un baño termostataado con agitación orbital a 100 oscilaciones por minuto. El inóculo empleado correspondía al 10 % del volumen final, con una concentración alrededor de 1 g/l. El volumen de muestra fué de 7 ml.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

FASE ACIDOGENICA

Se analizan tres aspectos: la influencia de la temperatura sobre las variables cinéticas, el valor óptimo de temperatura y la determinación del tiempo de cambio de fase acidogénica a solventogénica.

Con los datos experimentales se calcularon las velocidades específicas de crecimiento y la duración de la fase de adaptación de acuerdo con la descripción de la curva de crecimiento que hace Zwietering, et al⁽¹⁵⁾. En la Figura 1 se grafica la velocidad específica de crecimiento (μ), y el tiempo de adaptación, o fase lag, en función de la temperatura. Se encontraron los valores del número de generaciones (n), presentando un valor muy similar (valor promedio de 3.02 generaciones); es importante notar que éste resultado depende primordialmente de la cantidad inicial de biomasa, la cual osciló alrededor de 0.171 g/l.

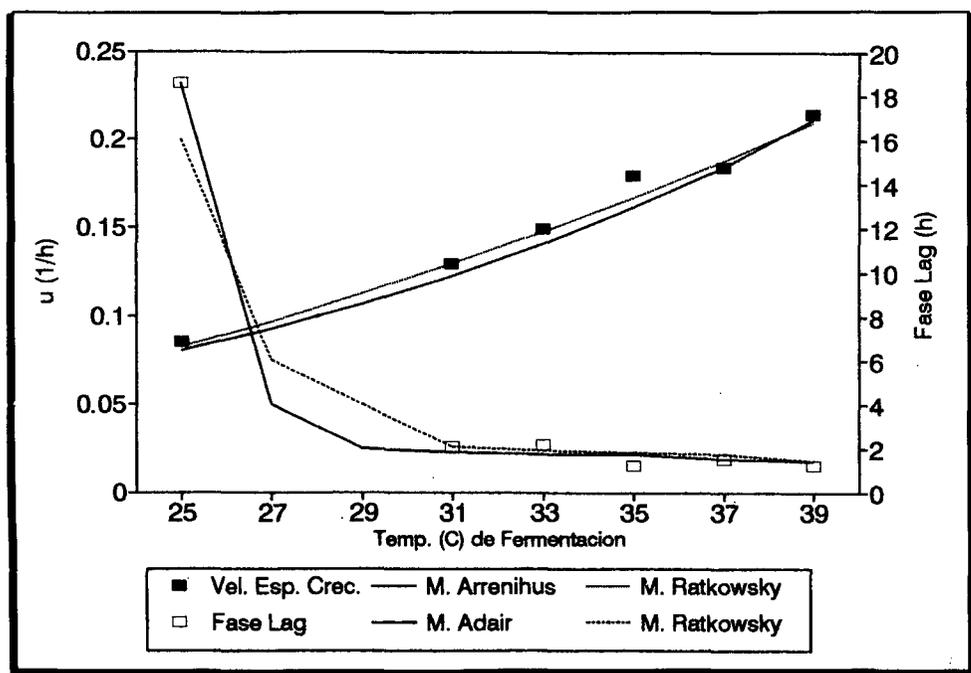


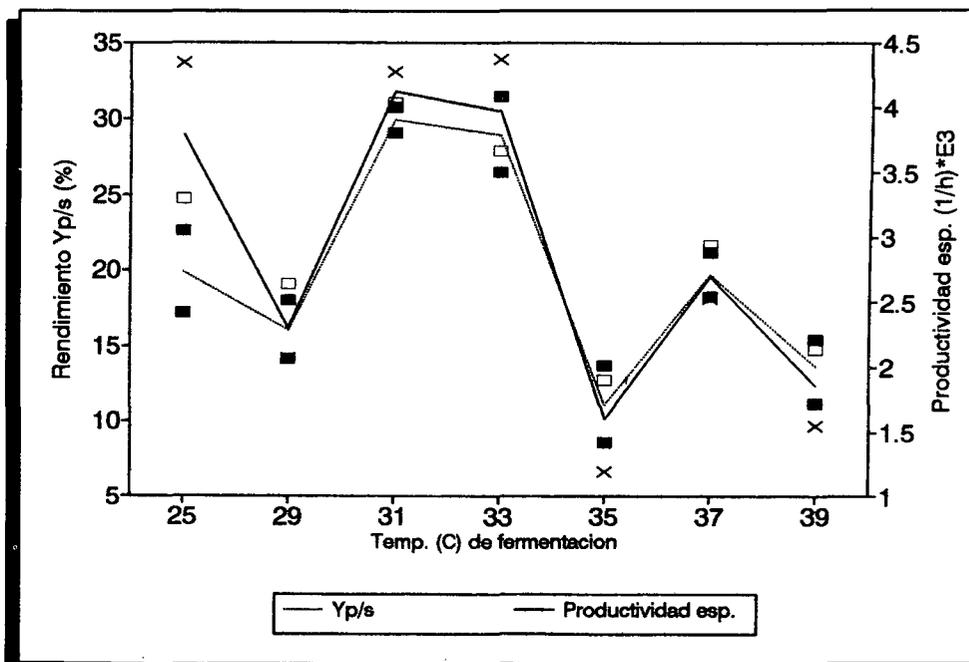
Figura 1. Variación de u y la Fase Lag - vs - temperatura de fermentación

Según McNeil⁽⁷⁾ la velocidad específica de crecimiento (μ) oscila entre 0.04 y 0.105 h⁻¹ (medio sintético), en el intervalo de 22° a 42 °C; para el caso de melazas, los trabajos previos reportan valores entre 0.06 y 0.14 h⁻¹ dependiendo de la concentración del medio⁽¹¹⁾ y la cepa⁽¹²⁾. Los valores encontrados se encuentran entre 0.08 y 0.21 h⁻¹, para el intervalo de temperatura estudiado entre 25° y 39 °C.

En la Figura No. 1 se muestran y comparan los resultados experimentales de μ con los modelos de Arrhenius y Ratkowsky 1 (μ vs. T), ya que solo éstos dos permiten ajustar los datos en el intervalo exponencial de la curva. La energía de activación calculada por la ecuación de Arrhenius es de 53.43 kJ/g-mol (6424.36 cal/g-mol), valor que está muy cercano al intervalo reportado para el crecimiento (60 - 85 kJ/g-mol)⁽⁹⁾. En el modelo de Ratkowsky se encuentra una constante (T_{min}), la cual se determina extrapolando los datos de (μ)^{1/2} vs. T, (para mesófilos se encuentra entre 270 y 280 K ⁽¹⁶⁾); utilizando los valores experimentales, el valor para esta constante es 274.6 K (1.6 °C).

El tiempo de adaptación o fase lag se debe fundamentalmente al choque térmico ocasionado por el cambio desde la temperatura de incubación del inóculo hasta la respectiva temperatura de fermentación. La fase lag (Figura 1) disminuye asintóticamente a medida que la temperatura aumenta; en el intervalo de 33° a 39 °C, el tiempo de adaptación no fue superior a dos horas, comprobando que cuando se realiza un cambio de temperatura pequeño por encima o por debajo, no existe mucha influencia sobre la adaptación del cultivo; cuando el choque es muy grande, por ejemplo 12 °C, se altera el cultivo, disminuyendo la velocidad específica de crecimiento (Figura 1), y aumentando los tiempos de adaptación (14-18 h). Los modelos para describir los tiempos de adaptación utilizados fueron el de Ratkowsky y el de Adair modificado. La modificación al modelo de Adair consistió en tomar el tiempo de adaptación (L) y no el logaritmo natural de éste. Los resultados experimentales y los modelos se grafican en la Figura 1. La constante de los modelos para la fase de adaptación (T_{min}) correspondiente a la temperatura a la cual no hay crecimiento, para el modelo de Adair es de 24.53 °C y para el de Ratkowsky es de 21.57 °C.

Figura 2. Rendimiento y productividad específica en la fase acidogénica



Los rendimientos en biomasa y solventes y la productividad específica en solventes fueron determinados entre las horas 68 y 72. Los resultados se muestran en la Figura No. 2.

La Tabla No. 1 muestra el comportamiento de la producción de solventes (corresponden a los promedios de los experimentos realizados por triplicado) y la figura No. 3 presenta la relación butanol/acetona en función de la temperatura, evaluados a la hora 72 de cada una de las fermentaciones.

En la Tabla No. 1 se observa que al aumentar la temperatura, aumentan los porcentajes de etanol y butanol, y disminuye el de acetona. En la literatura, para un medio de cultivo a base de melazas, el porcentaje de acetona aumenta con el aumento de la temperatura; la diferencia con los resultados encontrados en este trabajo se puede deber a las pérdidas por evaporación de la acetona.

temperaturas. En el intervalo de transición de la fase acidogénica a la solventogénica se presenta una disminución en la velocidad específica de crecimiento y un aumento en la velocidad específica de producción de solventes.

En la Tabla 2 y la Figura 4d se presentan los resultados obtenidos para el cambio de la fase de acidogénica a solventogénica; este valor corresponde al tiempo total transcurrido menos el tiempo de adaptación. El momento de cambio de la fase acidogénica a la solventogénica para el intervalo de temperatura estudiado presenta un comportamiento lineal e inverso, es decir, a medida que aumenta la temperatura, el cambio se induce más rápidamente (tiempo de cambio menor).

Teniendo en cuenta que la velocidad específica de crecimiento (μ) aumenta con la temperatura, que la máxima producción y rendimiento en solventes y velocidad específica de

FASE ACIDOGENICA				FASE SOLVENTOGENICA			
Temp de Ferm.	% de Solventes			T (°C)	% de Solventes		
	EtOH	Acet.	ButOH		EtOH	Acet.	ButOH
29	1.9	33.3	64.7	24	3.0	31.8	65.1
31	9.0	26.5	64.5	27	3.8	29.0	67.9
33	10.0	23.0	67.0	30	3.4	29.4	67.2
35	9.9	23.4	66.6	35	3.0	23.2	73.4
37	11.6	18.7	69.6				
39	11.7	24.5	68.74				

TABLA 1. Proporción de solventes

Para poder determinar el intervalo de tiempo en el cual se produce el cambio de la fase acidogénica a la solventogénica, se tomó la producción de biomasa y solventes como variable respuesta.

Se calcularon porcentualmente las velocidades específicas de crecimiento (μ) y de producción de solventes (q_p). La Figuras 4 a, b, c muestran los valores y las curvas para tres

producción de solventes se encuentran entre 31° y 33 °C, y que las variables pH, velocidad específica de consumo de azúcares no influyen apreciablemente⁽⁹⁾, se determinó el intervalo de 31° a 33 °C como el apropiado para la fase acidogénica con la cepa IBUN10, para el medio de cultivo especificado; dentro de éste intervalo el valor óptimo es 33 °C por presentar los mejores resultados. Para ésta temperatura corresponde un intervalo de tiempo en el cual se realiza el cambio de la fase acidogénica a solventogénica, comprendido entre las horas 16 y 18 (Tabla No.2) más la duración de la fase de adaptación.

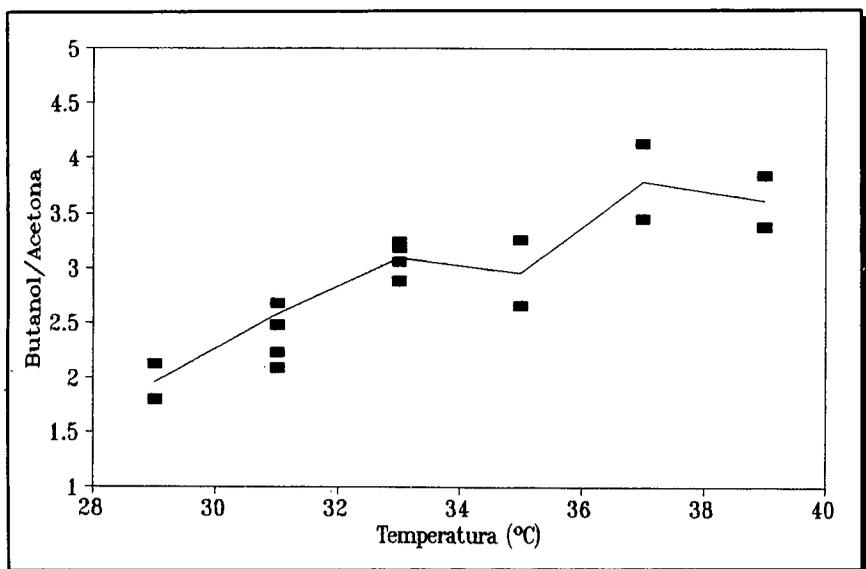


Figura 3. Relación Butanol / Acetona Fase Acidogénica

Temperatura (°C)	Tiempo de cambio (h)	
	Ensayo No.1	Ensayo No.2
29	21.5	21.0
31	17.5	18.0
33	14.5	17.0
35	—	11.0
37	12.5	12.0
39	6.0	6.5

Tabla 2. Tiempo de cambio de fase acidogénica a solventogénica

FASE SOLVENTOGENICA

El análisis de las fermentaciones solventogénicas está enfocado a determinar su efecto sobre las principales variables y a encontrar el intervalo óptimo de temperatura solventogénica.

En las fermentaciones solventogénicas se evaluaron la velocidad específica de crecimiento a 33 °C, el consumo de sustrato, la producción de solventes, la proporción de solventes obtenidos y los rendimientos y productividad específica. En la Tabla No. 3 se muestran las velocidades específicas de crecimiento de algunas fermentaciones, correspondientes a la temperatura de 33 °C (temperatura acidogénica), con su correspondiente tiempo de adaptación.

En las fermentaciones solventogénicas la producción de solventes se prolonga hasta la hora 44 para temperaturas superiores ó iguales a 30°C, y 67 para menores ó iguales a 27°C.

T °C	No.	$\mu(h^{-1})$	t lag (h)
33 - 30	1	0.151	1.30
	2	0.167	1.91
	3	0.131	3.67
	4	0.135	4.70
33 - 35	1	0.159	2.41
	2	0.156	2.73

Tabla 3. Valores de velocidad específica de crecimiento y tiempos de adaptación a 33 °C

La temperatura influye sobre algunas variables como la relación de solventes producidos, que se ve afectada de manera similar a los resultados obtenidos para la fase acidogénica (ver Tabla 1). La acetona disminuye con el aumento de la temperatura desde 30% a 23% en el intervalo estudiado (24° a 35 °C), el etanol aumenta desde 1% hasta 4%, y el Butanol desde 65% hasta 73%. A pesar del comportamiento similar, el etanol presenta una menor proporción con respecto a las fermentaciones acidogénicas (en las fermentaciones acidogénicas el valor promedio fue del 7% de los solventes totales, y en las solventogénicas fue el 3%, Tabla 1). La relación Butanol/Acetona varía de 2 a 3.2 desde 24° hasta 35 °C (ver Figura 5).

El consumo total de sustrato no es afectado por el cambio de temperatura. La velocidad específica de consumo de sustrato $-q_s$ no sufrió alteraciones entre temperaturas solventogénicas. La temperatura afecta la producción de solventes en el valor máximo y el retardo de la aparición de éste.

En la Figura 6 puede observarse que los valores máximos corresponden a 35°, 33°, 30 °C (los valores más cercanos a la temperatura acidogénica). A 33 °C se presenta el pico mucho antes que a las demás temperaturas, evidenciando un efecto de adaptación a la nueva temperatura.

El rendimiento en solventes $Y_{p/s}$ (ver Figura 7), que depende de la temperatura solventogénica, presenta los máximos valores a 27° y 30°C (temperaturas solventogénicas), generando una meseta. Globalmente, los rendimientos dieron mayores con respecto a los equivalentes en la fase acidogénica y más cercanos a los valores reportados ⁽⁶⁾.

Para determinar el intervalo adecuado en la fase solventogénica, se tomó como criterio el $Y_{p/s}$, la productividad y la productividad específica.

Para determinar el intervalo adecuado en la fase solventogénica, se tomó como criterio el $Y_{p/s}$, la productividad y la productividad específica. En la Figura No. 7 se observa que existen mesetas entre 27° y 33 °C para $Y_{p/s}$, entre 30° y 35 °C para la productividad, pero en la curva de la productividad específica se presenta un máximo a 30°C; el intervalo entre 30° y 33°C resultó ser el apropiado para la fase solventogénica y, dentro de éste, 30 °C es el óptimo por presentar los valores más altos de productividad específica. Es importante notar que la temperatura solventogénica no influye tan notoriamente como la acidogénica sobre los resultados de la fermentación.

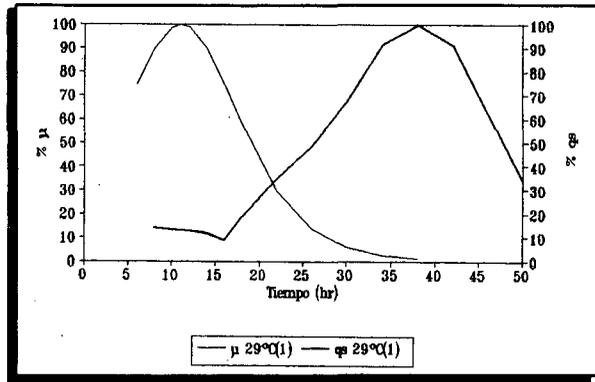


Figura 4 - a.
%μ, %qs vs
Tiempo
Fermentación
Acidogénica a
29°

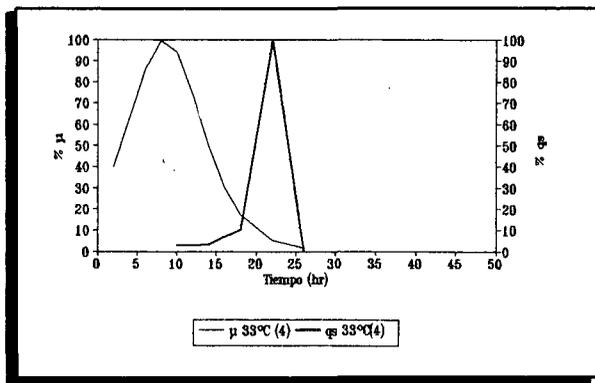


Figura 4 - b.
%μ, %qs vs
Tiempo
Fermentación
Acidogénica a
33°

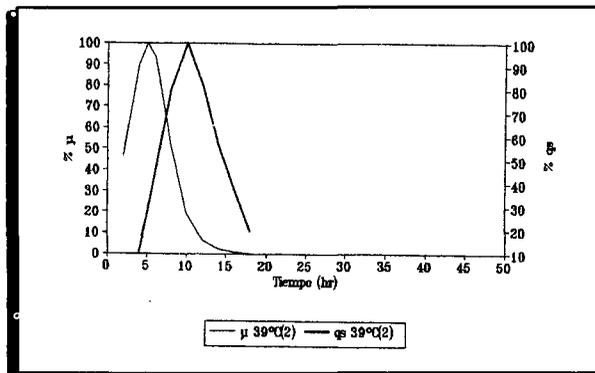


Figura 4 - c.
%μ, %qs vs
Tiempo
Fermentación
Acidogénica a
39°

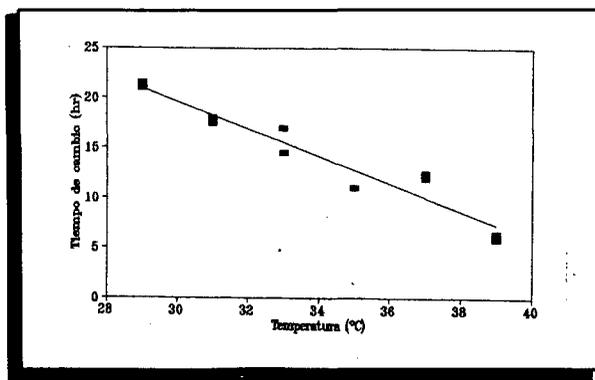


Figura 4 - d.
Tiempo de
cambio de
fase
Acidogénica a
Solventogénica

Figura 5. Relación Butanol/Acetona Fase solventogénica

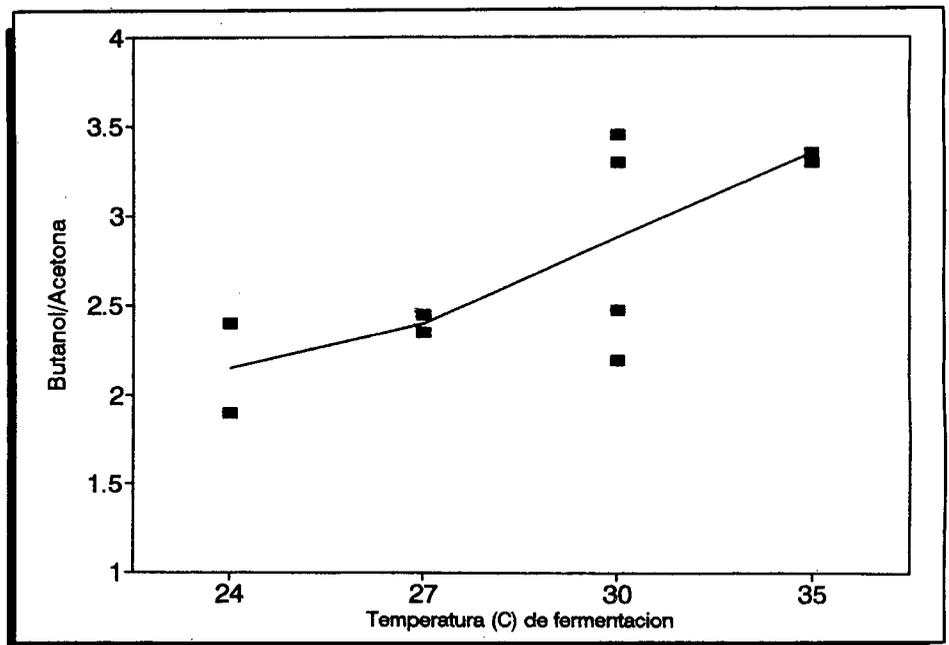
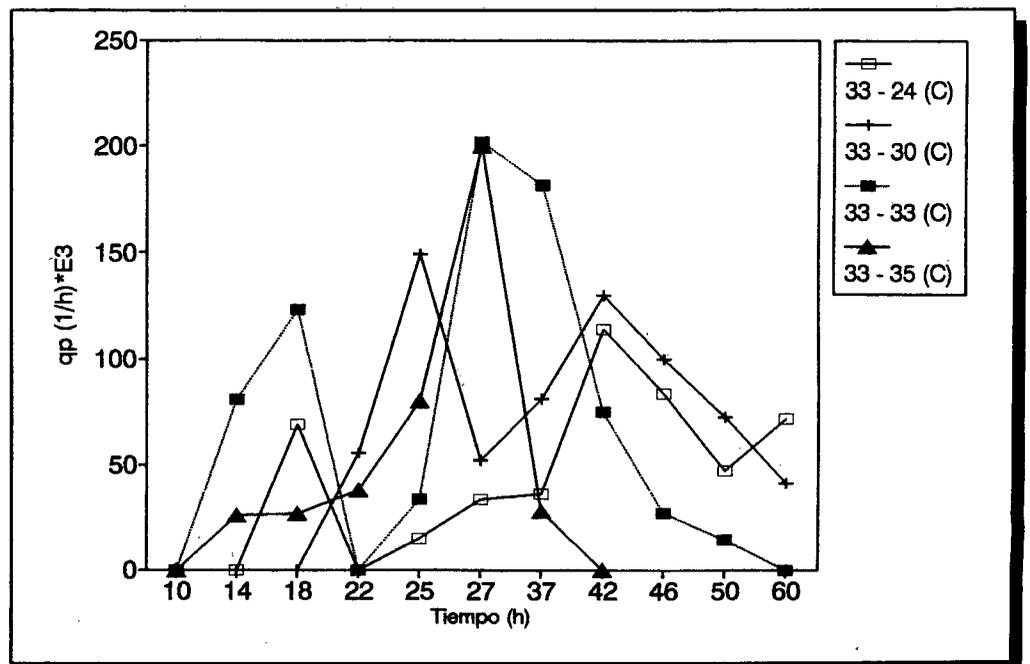


Figura 6. Velocidad Específica de producción de solventes



CONCLUSIONES

Los resultados aquí mostrados son útiles para los trabajos asociados a esta fermentación, entre otros para evaluar diferentes formas de proceso (lotes, continua, extractiva, células inmovilizadas, etc.).

El efecto de la temperatura sobre esta fermentación se ha estudiado en pocos trabajos ^(6,7) ya que dependen de la cepa. El efecto de la temperatura así como el cambio de temperatura ⁽¹⁾ en general es cualitativamente el mismo que sobre los demás microorganismos. Los resultados aquí mostrados, son cuantitativamente válidos solamente para la cepa y metodologías utilizadas.

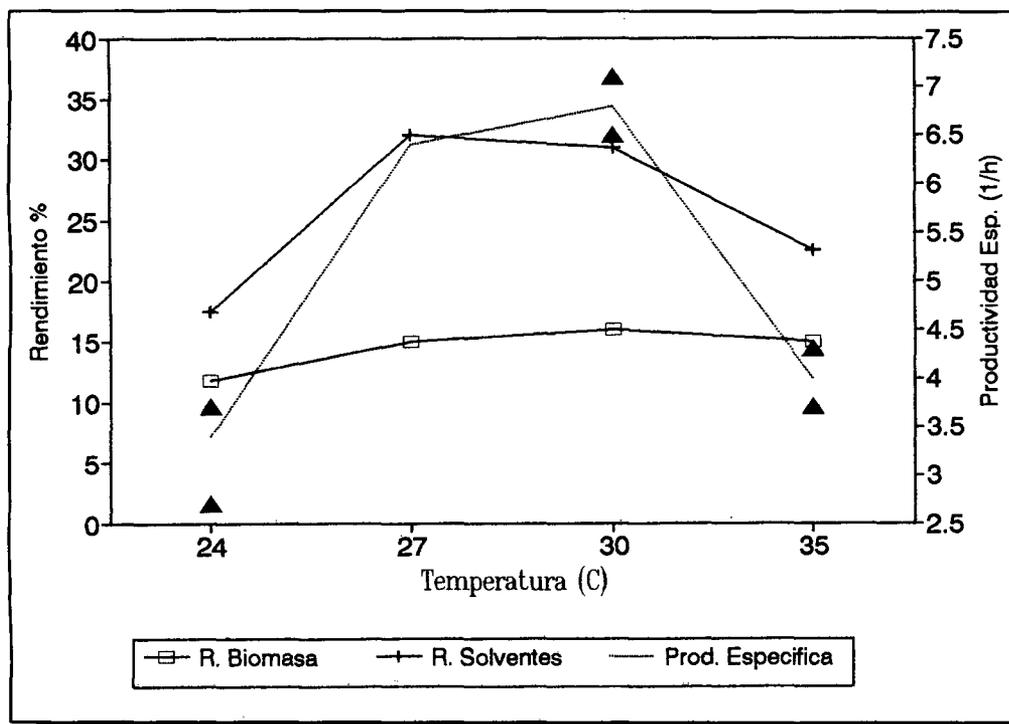


Figura 7. Rendimientos y Productividad En la fase Solventogénica

Se han propuesto modelos de μ vs. T que involucran términos de entalpía y entropía^(3,16). Para la FAVE se desarrolló un modelo⁽¹³⁾, que sin embargo, no contempla la temperatura como variable, lo cual muestra la gran complejidad de la investigación.

Las temperaturas óptimas acidogénica y solventogénica corresponden a un equilibrio técnico y económico. Desde el primer punto de vista, se encontró que el intervalo óptimo acidogénico esta entre 31° y 33 °C y el solventogénico entre 30° y 33 °C en medios a base de melaza; dentro de éstos intervalos a 33° y 30 °C son las temperaturas óptimas respectivamente.

La temperatura ejerce un gran efecto sobre la velocidad de cambio del consumo de sustrato y sobre la producción de biomasa, solventes y gases. Además ejerce un efecto combinado con el tiempo; a medida que disminuye la temperatura se retarda el momento en el cual se presentan los valores máximos para los parámetros estudiados: velocidad específica de crecimiento μ , velocidad específica de consumo de sustrato q_s , y producción de solventes q_p .

BIBLIOGRAFIA

- 1- ATKINSON, B. Y MAVITUNA, F. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. McMillan Publishers Ltd. London. England 1983.
- 2- BAER, S.H., BLASCHEK, H.P Y SMITH, T.L. "Effect of butanol challenge and temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol-tolerant". Appl. and Environmental Microbiology. Vol. 25, Dec. 1987, pp 2854-2861.
- 3- BAILEY, J.E, OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw Hill International, 22 edition, 1986.
- 4- CABRERA, N.S., CRUZ, L.F. "Estudio del efecto de la temperatura sobre la fermentación acetobutílica". Tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia. Depto. de Ing. Química, para optar al título de Ingeniero Químico. 1992.
- 5- DEMAİN, A.L. Y SOLOMON, N.A., EDS. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1986, caps. 3 y 8.
- 6- MCCUTCHAN, W.N., HICLEY, R.I. "The butanol acetone fermentations". Industrial Fermentations. Chemical Publishing Co., 1954, 347-352.
- 7- MCNEIL, B., KRISTIANSEN, B. "Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch culture of *C.I. acetobutylicum*". Biotechnology Letters. Vol. 7, No 7, 1985, p. 499-502.
- 8- "The acetone butanol fermentation". Advances in Applied Microbiology. Vol 31, 1986, Academic Press inc.
- 9- PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, 1975, Cap. 2, 13, 19.
- 10- SERRANO, G., PINZON, E. "Estudio de prefactibilidad económica para la producción de acetona butanol por fermentación". Tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia. Depto. de Ing. Química, para optar al título de Ingeniero Químico. 1987.
- 11- SIERRA, J., ACOSTA, R. "Estandarización y optimización de los medios de cultivo aptos para la fermentación acetobutílica". Tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia, Dept. Farmacia, para optar al título de Químico Farmacéutico. 1986.
- 12- SILVA, E. "Producción de acetona butanol por cultivo continuo con *C.I. acetobutylicum*". Tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia, Dept. Farmacia, para optar al título de Químico Farmacéutico.